



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE METALES PESADOS (Zn y Cu) EN EL DESARROLLO Y CONTENIDO DE LÍPIDOS, AZÚCARES Y CLOROFILAS EN CULTIVO DE HORTALIZAS

Trabajo Final de Grado

Ingeniería de Sistemas Biológicos

Autor: Andrés Mauricio Perdomo Vargas

Tutora: Nuria Cañameras

Fecha: 08 / junio / 2020

Resumen

La contaminación del medioambiente con metales pesados es un tema que concierne a nivel mundial. Estos metales se pueden acumular en el suelo, fuentes de agua y ser asimilados por las plantas en su forma iónica. Los problemas derivados de contaminación por metales no sólo implican a la especie vegetal, también puede afectar a los humanos que hacen de los vegetales una fuente de alimento. Las actividades antropogénicas hacen que la concentración de metales aumente, por ejemplo, la fertilización del suelo y uso de pesticidas de forma no controlada.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto que tiene la adición de dos metales pesados, zinc y cobre (Zn y Cu), en el desarrollo y contenido de lípidos, azúcares y clorofilas en cultivos de hortalizas en invernadero fertilizados con lodos de depuradora. Se utilizaron tres dosis diferentes de metales, siendo las especies vegetales utilizadas la lechuga (*Latuca sativa* L. variedad Maravilla) y el rábano (*Raphanus sativus* tipo redondo rojo), ambas cultivadas en contenedor. Los cultivos fueron sometidos a riego diario. El suelo utilizado procedía de una parcela de Agrópolis (unidad científico técnica de la UPC). Las lechugas y los rábanos se cosecharon pasados 57 y 36 días, respectivamente.

En las lechugas, el análisis estadístico de diferentes parámetros como crecimiento vegetal, contenido de clorofilas, lípidos y carbohidratos no resulta ser significativo. Tampoco se observaron síntomas aparentes de toxicidad. En cuanto a los rábanos, se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila, siendo las plantas tratadas con dosis media las que tenían un contenido inferior al resto. El resto de parámetros de biomasa y contenido de lípidos y carbohidratos no mostraron diferencias significativas.

Resum

La contaminació del medi ambient amb metalls pesants és un tema que afecta a nivell mundial. Aquests metalls es poden acumular al sòl, a les fonts d'aigua i a més poden ser assimilats per les plantes en la seva forma iònica. Els problemes derivats de la contaminació amb metalls no impliquen tan sols a l'espècie vegetal, sinó que també poden afectar als humans que aprofiten els vegetals com a font d'aliment. Les activitats antropogèniques fan que les concentracions de metalls augmentin, per exemple, amb la fertilització del sòl y l'ús de pesticides de forma no controlada.

L'objectiu principal d'aquest treball és avaluar l'efecte que té l'adició de dos metalls pesants, zinc y coure (Zn y Cu), en el desenvolupament y contingut de lípids, sucres i clorofil·les en cultius d'hortalisses en hivernacle fertilitzats amb fangs de depuradora. Es van emprar tres dosis diferents de metalls, sent les espècies vegetals utilitzades l'enciam (*Latuca sativa* L. varietat Meravella) i el rave (*Raphanus sativus* tipus rodó vermell), les dues van ser cultivades en contenidor. Els cultius van ser sotmesos a reg diari. El sòl emprat provenia d'una parcel·la d'Agròpolis (unitat científic-tècnica de la UPC). La collita dels enciams i els raves va ser passats 57 i 36 dies, respectivament.

En els enciams, l'anàlisi estadístic de diferents paràmetres com el creixement vegetal, contingut de clorofil·les, lípids i carbohidrats no va resultar ser significatiu. Tampoc es van observar símptomes aparents de toxicitat. Respecte als raves, es van trobar diferències significatives en el contingut de clorofil·la. Les plantes tractades amb dosis mitja van resultar en contingut inferior de clorofil·la. La resta de paràmetres de biomassa y contingut de lípids i carbohidrats no van mostrar diferències significatives.

Abstract

Pollution of environment with heavy metals it is a global concern. These metals can accumulate in soil, water sources and can be assimilated by plants in their ionic form. The problems derived from metal contamination not only involve the plant species, they can also affect humans that use vegetables like source of food. Anthropogenic activities cause the concentration of metals to increase, for example, with fertilization of soil and the use of pesticides in an uncontrolled way.

The aim of this study is to evaluate the effect of two heavy metals, zinc and copper (Zn and Cu), has on the development and content of lipids, sugars and chlorophylls in a greenhouse vegetable crops fertilized with sewage sludge from a wastewater treatment plant. Three different doses of metals were used, the plant species used were lettuce (*Latuca sativa* L. var. Maravilla) and radish (*Raphanus sativus* round red type), both grown in containers. The crops were submitted to daily irrigation with water. The soil used came from a plot in Agrópolis (UPC scientific-technical unit). Lettuces and radishes were harvested after 57 and 36 days, respectively.

From lettuces, statistical analysis of different parameters such as plant growth, chlorophyll, lipid and carbohydrate content did not show significant differences. Either not apparent toxicity symptoms were observed. Regarding radishes, significant differences were found in the chlorophyll content, being the plants treated with medium dose those with a lower content than rest. Other parameters such as biomass, and lipid and carbohydrate content did not show significant differences.

Sumario

Agradecimientos	11
1. Introducción	13
1.1. Metales pesados	13
1.2. Fangos de depuradora	17
1.3. Contexto del trabajo	19
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Materiales y métodos	23
3.1. Material vegetal	23
3.2. Tipo de contenedor	23
3.3. Suelo y fertilización	24
3.4. Metales pesados	26
3.5. Riego	26
3.6. Tratamientos del experimento	27
3.7. Diseño del experimento	27
3.7.1. Dosificación de metales pesados	27
3.7.2. Montaje y distribución	28
3.7.3. Duración y condiciones de cultivo	30
3.8. Determinación de biomasa	32
3.9. Crecimiento vegetal	34
3.10. Determinación de lípidos y carbohidratos	35
3.11. Determinación de clorofilas	37
3.12. Tratamiento estadístico	40
4. Resultados	42



4.1.	Biomasa	42
4.1.1.	Biomasa de lechuga	42
4.1.2.	Biomasa de rábano	43
4.2.	Crecimiento vegetal	46
4.2.1.	Longitud y número de hojas en lechuga.	46
4.2.2.	Longitud y número de hojas en rábano	49
4.3.	Contenido de lípidos y carbohidratos	52
4.4.	Composición de clorofilas	54
4.4.1.	Estimación de la composición de clorofilas en lechuga según dosis aplicada	54
4.4.2.	Estimación de la composición de clorofilas en lechuga según posición de la hoja	55
4.4.3.	Estimación de la composición de clorofilas en rábano según dosis aplicada	57
4.4.4.	Estimación de la composición de clorofilas en rábano según posición de la hoja	59
5.	Discusión	62
	Conclusiones	66
	Referencias	67

Índice de tablas

<i>Tabla 1-1. Valores genéricos de referencia (NGR) de metales pesados en suelos para protección de ecosistemas en zonas agropecuarias y forestales</i>	17
<i>Tabla 1-2. Valor límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria</i>	18
<i>Tabla 3-1. Características principales del suelo empleado en el experimento (s.m.s.: sobre materia seca)</i>	24
<i>Tabla 3-2. Características principales del fango empleado en el experimento (s.m.f.: sobre materia fresca; s.m.s.: sobre materia seca)</i>	25
<i>Tabla 3-3. Concentración de metales pesados añadidos a cada contenedor dependiendo de la dosis</i>	27
<i>Tabla 3-4. Sorteo aleatorio del número de contenedor por dosis y especie vegetal</i>	29
<i>Tabla 3-5. Duración de cultivo experimental de cada especie vegetal</i>	30
<i>Tabla 3-6. Duración y condiciones de riego</i>	31
<i>Tabla 3-7. Ecuaciones simultaneas para cuantificar clorofilas en tejido vegetal a partir de absorbancias y en cubeta de 1 cm</i>	39
<i>Tabla 4-1. Resultados de la determinación de biomasa en lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia de 5%</i>	43
<i>Tabla 4-2. Resultados de la determinación de biomasa de hojas y bulbo en rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia de 5%</i>	45
<i>Tabla 4-3. Resultados de la determinación de hoja más larga y número de hojas totales en cultivo de lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valores promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	48
<i>Tabla 4-4. Resultados de la determinación de hoja más larga y número de hojas totales en cultivo de rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valores promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	51
<i>Tabla 4-5. Resultados de la determinación de lípidos y carbohidratos en hojas de lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	52
<i>Tabla 4-6. Resultados de la determinación de lípidos y carbohidratos en bulbo de rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	53
<i>Tabla 4-7. Resultados de la determinación de clorofilas <i>a</i>, <i>b</i> y totales en lechuga según la dosis de metales pesados añadida. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	55
<i>Tabla 4-8. Resultados de la determinación de clorofilas <i>a</i> en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%</i>	56

Tabla 4-9. Resultados de la determinación de clorofilas b en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% __ 56

Tabla 4-10. Resultados de la determinación de clorofilas totales en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% _____ 57

Tabla 4-11. Resultados de la determinación de clorofilas a , b y totales en rábano según la dosis de metales pesados añadida. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% _____ 58

Tabla 4-12. Resultados de la determinación de clorofilas a en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% __ 60

Tabla 4-13. Resultados de la determinación de clorofilas b en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% __ 60

Tabla 4-14. Resultados de la determinación de clorofila total en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5% _____ 60

Índice de figuras

<i>Figura 3-1. Contenedor para el cultivo en invernadero</i>	23
<i>Figura 3-2. Presentación de metales pesados objeto de estudio en este experimento</i>	26
<i>Figura 3-3. Cultivo con riego por goteo en el invernadero de Agrópolis</i>	26
<i>Figura 3-4. (Izquierda) Planta de lechuga y (derecha) semillas de rábano con gotero al inicio del experimento</i>	29
<i>Figura 3-5. Cultivo experimental en invernadero la primera semana</i>	29
<i>Figura 3-6. Esquema gráfico de la distribución aleatoria por especie vegetal y dosis de metales pesados añadidos. A la derecha de cada casilla se indica la especie vegetal L y R, lechuga y rábano respectivamente. (D0: dosis control; D2: dosis media; D4: dosis alta)</i>	32
<i>Figura 3-7. (A) Muestras de rábano correctamente etiquetadas, (B) hojas de rábano identificadas para desecar en estufa a 80 °C, y (C) hojas de rábano después de estar en estufa durante 2 días</i>	33
<i>Figura 3-8. (Izquierda) Semillas de rábano sembradas el primer día de experimento, (Centro) brotes de rábano al cabo de 2 semanas de la siembra, y (Derecha) planta de rábano en el momento de la cosecha</i>	34
<i>Figura 3-9. Tubos de vidrio enumerados para ser pesados en balanza analítica</i>	36
<i>Figura 3-10. (A) Peso de filtro de nylon en balanza analítica con resolución de 0,01 mg y exactitud $\pm 0,005$ mg, y (B) ampliación de imagen</i>	36
<i>Figura 3-11. Medidor OPTI-SCIENCES CCM-200 plus utilizado para medir valor relativo de clorofila</i>	38
<i>Figura 4-1. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte aérea de lechuga según dosis aplicada de metales pesados</i>	42
<i>Figura 4-2. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte aérea de rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	44
<i>Figura 4-3. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte subterránea de rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	45
<i>Figura 4-4. Plantas de lechuga que presentan hojas secas</i>	46
<i>Figura 4-5. Representación de la evolución de (A) longitud de hoja más larga y (B) número total de hojas en lechuga según dosis aplicada de metales pesados</i>	47
<i>Figura 4-6. Resultados de (A) longitud de hojas más larga (cm) y (B) número total de hojas en lechuga según dosis aplicada de metales pesados</i>	48
<i>Figura 4-7. Representación de la evolución de (A) longitud de hoja más larga y (B) número total de hojas en rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	50
<i>Figura 4-8. Resultados de (A) longitud de hojas más larga (cm) y (B) número total de hojas en rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	51

<i>Figura 4-9. Contenido de (A) lípidos (%) y (B) carbohidratos (%) en lechuga según dosis aplicada de metales pesados</i>	52
<i>Figura 4-10. Contenido de (A) lípidos (%) y (B) carbohidratos (%) en rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	53
<i>Figura 4-11. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm^2), (B) clorofilas b (mg/cm^2) y (C) clorofilas totales (mg/cm^2) en lechuga según dosis aplicada de metales pesados</i>	54
<i>Figura 4-12. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm^2), (B) clorofilas b (mg/cm^2) y (C) clorofilas totales (mg/cm^2) en lechuga según dosis aplicada y posición exterior</i>	55
<i>Figura 4-13. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm^2), (B) clorofilas b (mg/cm^2) y (C) clorofilas totales (mg/cm^2) en rábano según dosis aplicada de metales pesados</i>	58
<i>Figura 4-14. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm^2), (B) clorofilas b (mg/cm^2) y (C) clorofilas totales (mg/cm^2) en rábano según dosis aplicada y posición exterior</i>	59

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la profesora Nuria Cañameras por la oportunidad de poder realizar este trabajo. Su ayuda fue brindada en todo momento, desde el comienzo el primer día en el invernadero hasta la corrección final de este trabajo. También quiero agradecer a la profesora Nuria Carazo por su ayuda y compañía en más de una ocasión en Agrópolis.

En segundo lugar, me gustaría agradecer al equipo del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), y en especial a Víctor Matamoros, Sergi Díez y Yolanda Rodríguez. Su ayuda en el laboratorio fue imprescindible para la extracción de lípidos y carbohidratos.

En tercer lugar, agradecer a Miquel Masip por la ayuda ofrecida en el invernadero de Agrópolis, y por supuesto a Olga Gener por sus comentarios en el laboratorio de Producción Vegetal de ESAB.

Por último, y no menos importante quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que me ha brindado siempre. Gracias a todos.



Introducción

1. Introducción

1.1. Metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos que tienen una densidad relativamente mayor que el agua. Forman parte de la corteza terrestre y existen de forma natural debido a deposiciones atmosféricas, erupciones volcánicas y corrosión de metales. Los metales pesados más comunes son cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), plomo (Pb), zinc (Zn) y arsénico (As). Aunque el As es un elemento semimetálico también se incluye en esta categoría por el efecto tóxico que tiene en los organismos vivos (Tangahu et al., 2011).

Los metales pesados se dividen en dos grupos (Rascio y Navari-Izzo, 2011; Tangahu et al., 2011):

- Elementos esenciales (micronutrientes) para plantas y animales en pequeñas cantidades, ya que interactúan con funciones bioquímicas y fisiológicas (ciclo biológico del organismo). En este grupo se encuentran algunos elementos como cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y zinc (Zn).
- Elementos no esenciales que no tienen función biológica y que con bajas concentraciones pueden generar efectos tóxicos. Algunos son cadmio (Cd), arsénico (As), mercurio (Hg), plomo (Pb) y selenio (Se).

Los micronutrientes son necesarios para las plantas para poder tener un crecimiento y metabolismo funcional. Diferentes enzimas en la planta se ven reguladas por la presencia de estos elementos. El problema se genera cuando los niveles son superiores o inferiores a las concentraciones fisiológicas requeridas. El efecto tóxico (fitotoxicidad) en la planta puede derivar en alteraciones a nivel celular y molecular por inactivación de enzimas, sustitución de otros elementos esenciales o daño en la membrana celular (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

Los metales pesados también se pueden catalogar como elementos no biodegradables. La contaminación puede llegar a diferentes partes del ecosistema como el suelo y fuentes hídricas. Estos elementos pueden llegar entonces hasta los humanos a través de la cadena alimentaria, debido a procesos de bioacumulación y biomagnificación en niveles inferiores de la cadena trófica. El alimento es la fuente



más común de entrada de metales pesados en humanos, especialmente, aquellos procedentes de cultivos que crecen en suelos contaminados (Alves et al., 2016). El consumo de estos alimentos contaminados puede causar deficiencia de nutrientes esenciales en el cuerpo y derivar en problemas inmunológicos, desnutrición, y mayor probabilidad de cáncer gastrointestinal (Arora et al., 2008).

Contaminación de suelos

Aunque los metales pesados son componentes naturales del suelo, las actividades antropogénicas hacen que sus concentraciones aumenten. Estos elementos pueden depositarse en el suelo debido al uso de aguas residuales o regeneradas para regar, fundición de metales, minería, fabricación de combustibles y uso de ciertos fertilizantes como son los lodos de depuradora, o bien otras sustancias químicas utilizadas en la agricultura (Ashraf et al., 2019).

Una de las principales fuentes naturales de metales pesados es la formación de rocas. La composición y concentración de metales depende del tipo de roca y condiciones ambientales. Otra fuente natural, es la emisión de gases de volcanes que contiene grandes cantidades de Al, Zn, Mn, Pb, Ni, Cu y Hg (Nagajyoti et al., 2010). Las actividades humanas como el transporte de materiales de construcción y las propias emisiones vehiculares también pueden generar deposición atmosférica de metales pesados. También la minería genera una gran cantidad de metales ya sea de la propia actividad como sus residuos (Chibuike y Obiora, 2014).

En el ámbito agrícola, el uso de fertilizantes, fangos de depuradora, irrigación de aguas y pesticidas son las principales fuentes de metales pesados en suelos. El estiércol animal que se utiliza como abono también puede aumentar los niveles de Zn, Cu y Co en el suelo. La contaminación depende también de las características propias del suelo y la cantidad aportada (Nagajyoti et al., 2010). La aplicación de aguas residuales regeneradas provee a los suelos nutrientes y materia orgánica que aumentan la producción de los cultivos. No obstante, el uso prolongado de estas aguas puede derivar en la contaminación del suelo con metales (Alves et al., 2016).

Factores que afectan a la movilidad y biodisponibilidad

Los suelos contaminados con metales pesados pueden provocar fitotoxicidad en los cultivos. Parámetros del suelo como el pH, materia orgánica, tipo de suelo y potencial redox afectan a la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados (Khan et al.,

2015). A medida que aumenta el pH del suelo, la adsorción de iones metálicos también incrementa y, por lo tanto, disminuye su disponibilidad para la planta. La disminución del pH en el medio de cultivo aumenta la solubilidad de Zn y Cd, y aumenta cantidad asimilada por la planta (Wang et al., 2006). De igual forma, a medida que aumenta la proporción de materia orgánica en el suelo menor es la biodisponibilidad.

La absorción y acumulación de metales pesados difiere en cada especie vegetal debido a la morfología, fisiología y anatomía de cada una (Gupta et al., 2019). La concentración de metales que se acumula en la raíz o parte aérea de la planta es diferente dependiendo de la especie vegetal (Gharbi et al., 2005). Intawongse y Dean (2006) obtuvieron que las concentraciones de Zn en las hojas fueron mayores que las concentraciones en las raíces en rábanos cultivados en suelos contaminados con una mezcla de metales (Cd, Cu, Mn, Pb y Zn) y que en lechugas las concentraciones de Cu en las raíces fueron superiores a las concentraciones encontradas en hojas.

La presencia de diversos metales pesados puede generar procesos de antagonismo o sinergia. Por ejemplo, la adición de Cu al medio de cultivo puede provocar el incremento de la fitotoxicidad de Zn (Luo y Rimmer, 1995). De igual forma, concentraciones altas de Cu pueden provocar una deficiencia de microelementos como el Fe (Ebbs y Kochian, 1997; Reichman, 2002).

La concentración total de metales en el suelo incluye todas las fracciones de metal, solubles y no solubles. Pero hay que tener en cuenta que factores mencionados anteriormente como el pH y materia orgánica determinan la proporción disponible para la planta (Reichman, 2002).

Absorción por planta

Los metales pesados pueden entrar en la planta a través de sus raíces o área foliar. La raíz de la planta puede generar sustancias quelantes, cambios inducidos de pH y reacciones redox, para solubilizar y aceptar los micronutrientes del suelo (Tangahu et al., 2011). Una vez dentro, se pueden acumular en la raíz o ser transportados a través de xilema a las partes superiores de la planta. Las especies vegetales pueden almacenar y retener As en las vacuolas de las células radicales para impedir su movimiento hasta el xilema y evitar que altere el metabolismo de la planta (Clemens y Ma, 2016). El movimiento de metales pesados desde la raíz a la parte aérea se



conoce como traslocación de metales (Rai et al., 2019). Eissa y Negim (2018) obtuvieron que las concentraciones de Zn, Cu, Pb, Ni y Cd se disponían en mayor proporción en las raíces que en las hojas de lechugas y espinacas que crecían en suelos contaminados con metales pesados por el uso de aguas residuales.

Efectos adversos en las especies vegetales

Las plantas pueden presentar efectos desfavorables tanto por deficiencia de micronutrientes como por exceso. La deficiencia de iones Zn en la planta puede provocar crecimiento retardado y clorosis (Sturikova et al., 2018).

Concentraciones tóxicas de metales pueden derivar en la producción de especies oxígeno reactivas (EOR) como superóxidos ($O_2^{\cdot -}$) y radicales hidroxil ($\cdot OH$) (Berni et al., 2019). Cuando las concentraciones de EOR pasan de su umbral, la célula entra en un estado de estrés oxidativo e incrementa la oxidación de ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. Para combatir el exceso de EOR, las células vegetales generan enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y peroxidasa entre otras (Alves et al., 2016).

Algunos síntomas de toxicidad en plantas por exceso de iones metálicos son reducción en la fotosíntesis, inhibición de elongación de raíz, crecimiento de tallo retardado, clorosis en las hojas y necrosis de tejidos (Krämer y Clemens, 2006). Por ejemplo, la toxicidad de Cu puede afectar al contenido en clorofila de la planta (Pätsikkä et al., 2002; Zengin y Munzuroglu, 2005). El grupo de Kumar (Kumar et al., 2008) encontraron que el peso fresco y seco de las plantas disminuía cuando se aplicaba una concentración elevada de Cu (100 μM). Otros autores indican que las concentraciones de Zn en el medio cultivo (750 mg/Kg) pueden reducir en un 20% el contenido hídrico en el cultivo de espinaca (Naz et al., 2015).

La deficiencia de Fe en planta es un efecto común de toxicidad por Cu y Zn (Reichman, 2002). El efecto tóxico combinado de Cu y Zn también puede provocar menor asimilación de Mn en la parte aérea de las plantas y además mostrar clorosis en las hojas más nuevas (Ebbs y Kochian, 1997).

Valores límite de metales en suelos

En Cataluña se establecen unos niveles genéricos de referencia (NGR) en la Ley 5/2017 (Generalitat, 2017) en cuanto a metales en los suelos por aplicación de residuos. Estos niveles se establecen para la protección de los ecosistemas y la salud animal (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Valores genéricos de referencia (NGR) de metales pesados en suelos para protección de ecosistemas en zonas agropecuarias y forestales

Elemento	Valor NGR (mg/Kg suelo seco)
As	6
Co	25
Cu	90
Es	50
Hg	2
Mo	3,5
Ni	45
Zn	170

1.2. Fangos de depuradora

El uso de fangos de depuradora como fertilizante orgánico es una práctica que no sólo se utiliza para eliminar residuos sino también para aprovechar recursos. Es un material que contiene gran cantidad de materia orgánica, así como nitrógeno, fósforo y potasio entre otros que son nutrientes que las plantas necesitan y asimilan para un crecimiento adecuado. Además estos fangos también suelen incrementar el intercambio catiónico de minerales en el suelo, así como crear mayor cantidad de agregados.

En contraste a las ventajas que tiene el uso de fangos de depuradora, se tiene que tener en cuenta que este fertilizante puede ser una fuente de contaminantes para el suelo y las aguas freáticas. La mayoría de fangos contienen metales pesados, por eso su uso como abonos está limitado en función de su concentración para que no impliquen problemas para las especies vegetales y animales. La proporción efectiva de fango de depuradora que se añade a los cultivos para un mayor crecimiento vegetal



varía dependiendo de las condiciones del suelo y del tipo de cultivo (Rrong et al., 2016), pero siempre teniendo en cuenta su limitación por concentración.

El fango que se utiliza en la agricultura tiene que pasar por un proceso de estabilización para reducir el contenido en materia orgánica, modificar el pH y eliminar la presencia de microorganismos patógenos. En general, los fangos utilizados como fertilizantes aumentan el contenido de materia orgánica en el suelo, disminuyen su pH y aumentan la cantidad de varios micronutrientes como Cu, Zn, Ni, y Cr (Rorat et al., 2016).

Valores límite de metales en fangos

Los valores seguros de metales pesados que no presentan riesgo para los humanos son diferentes dependiendo si se analiza el fertilizante, el suelo o los alimentos. Para la fertilización con compuestos orgánicos como fango de depuradora, se fijan valores para Cd, Cu, Ni, Pb, Zn Hg y Cr dependiendo del pH del suelo en el que se aplican (Tabla 1-2). A nivel nacional, estos valores máximos están detallados en el Real Decreto 1310/1990 (Gobierno de España, 1990).

Tabla 1-2. Valor límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria

Elemento	Valores límite (mg/Kg s.m.s)	
	Suelo con pH < 7	Suelo con pH > 7
Cd	20	40
Cu	1000	1750
Ni	300	400
Pb	750	1200
Zn	2500	4000
Hg	16	25
Cr	1000	1500

s.m.s.: sobre materia seca

1.3. Contexto del trabajo

Este trabajo forma parte de un proyecto RETOS, financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. El título del proyecto es *Dinámica de la acumulación de antibióticos, metales y genes de resistencia bacteriana en cultivos agrícolas por fertilización orgánica. Implicaciones en la producción vegetal*. Tiene como código de referencia: AGL2017-89518-R.

Quienes lideran el proyecto son el Dr. Víctor Matamoros Mercadal y el Dr. Josep María Bayona Termens del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Este trabajo experimental se realiza en el invernadero de Agrópolis de la UPC, en los laboratorios de la ESAB y en los laboratorios del IDAEA-CSIC.

Previamente a este TFG, Sofía Jaray realizó, también vinculado al proyecto RETOS, su TFG. En dicho trabajo se valoró para cultivo de lechuga la dosis de fango de depuradora utilizada en este TFG.



Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo final de grado es evaluar el efecto que tiene la adición de dos metales pesados, zinc y cobre, en el desarrollo vegetal y contenido de lípidos, azúcares y clorofilas en dos cultivos de hortalizas (lechuga y rábano) en invernadero fertilizados con lodo de depuradora.

2.2. Objetivos específicos

A continuación, se definen los objetivos necesarios para poder alcanzar la finalidad del objetivo general:

- Determinar la biomasa final fresca y seca.
- Cuantificar el contenido de clorofilas a, b y totales.
- Identificar el crecimiento vegetal asociado a longitud y número de hojas.
- Valorar el contenido de lípidos y carbohidratos.

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Lechuga

Las lechugas que se usaron en este trabajo son de la especie *Lactuca sativa* L. variedad Maravilla. Se adquirió el plantel en la empresa Planters Lladó de Gavà.

Rábano

Se adquirieron semillas de la especie *Raphanus sativus* tipo redondo rojo, de la empresa Semillas Fitó. Se mantuvieron a baja temperatura (4°C) hasta el día de su siembra para mantener su viabilidad.

3.2. Tipo de contenedor

Para este experimento se utilizaron contenedores de cristal opaco de capacidad 2,5 L (diámetro= 15 cm, altura= 20 cm) con forma de embudo en su parte inferior para facilitar el drenaje (Fig. 3-1). Se usaron un total de 30 contenedores (5 repeticiones por tratamiento). Los tratamientos establecidos se explican en el apartado 3.6.



Figura 3-1. Contenedor para el cultivo en invernadero

3.3. Suelo y fertilización

El suelo utilizado fue una mezcla de suelo y arena fertilizado con fango de depuradora. El suelo procedía de una parcela de cultivo ubicada en Agrópolis (longitud 2°03_E, latitud 41°17_N) ubicada en Viladecans. La capa escogida fue la perteneciente al horizonte superior del suelo. Antes de ser fertilizado con el fango, el suelo material fue tamizado a 5 mm. El fango deshidratado, apto para uso agrícola, procedía de la estación de depuración de aguas residuales de Gavà-Viladecans.

Las principales características físico-químicas de este suelo y del fango están detalladas en la tablas 3-1 y 3-2. El análisis fue realizado por la empresa Eurofins Agroambiental, S.A.

Se trata de un suelo de textura franca y elevado contenido en fósforo ($> 21 \times 10^{-6}$ P) y potasio ($> 300 \times 10^{-6}$ K).

Tabla 3-1. Características principales del suelo empleado en el experimento (s.m.s.: sobre materia seca)

Textura	Franca (40% Arena, 16,2% Limo grueso, 19% Limo y 24,8% Arcilla)
pH	8,48
Conductividad eléctrica (CE)	0,240 dS/m
Humedad	1,33%
Materia orgánica	1,27% s.m.s.
N total	0,089 % s.m.s.
P	33 mg/Kg s.m.s.
Carbonato cálcico equivalente	28 % s.m.s.
Ca	7014 mg/Kg s.m.s.
Mg	362 mg/Kg s.m.s.
Na	91 mg/Kg s.m.s.
K	344 mg/Kg s.m.s.

Tabla 3-2. Características principales del fango empleado en el experimento (s.m.f.: sobre materia fresca; s.m.s.: sobre materia seca)

Materia seca 105°C	20,9 % s.m.f.
pH	8,4
Conductividad eléctrica (CE)	2,56 dS/m
Materia orgánica	51,5 % s.m.s.
N Kjeldahl	2,77 % s.m.s.
N amoniacal	1,34 % s.m.s.
P	1,55 % s.m.s.
K	0,207 % s.m.s.
Ca	7,0 % s.m.s.
Mg	0,480 % s.m.s.
Fe	1,49 % s.m.s.
Cd	0,51 mg/Kg s.m.s.
Cu	240 mg/Kg s.m.s.
Ni	53 mg/Kg s.m.s.
Pb	29 mg/Kg s.m.s.
Zn	699 mg/Kg s.m.s.
Hg	0,60 mg/Kg s.m.s.
Cr	57 mg/Kg s.m.s.
C/N	9,3

La dosis de fango de depuradora incorporada fue la misma para todos los tratamientos y equivalía a un contenido en N de 100 U.F. (unidades fertilizantes). Esta dosis fue elegida de acuerdo a los resultados experimentales que obtuvo Jaray (2019) en un TFG anterior realizado dentro del mismo proyecto de investigación donde utilizó 70,32 g fango húmedo/planta en cada contenedor de 2,5 L de capacidad.

3.4. Metales pesados

Los metales pesados que se usaron en este experimento fueron Zn y Cu en las siguientes presentaciones: sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), de la casa comercial Sigma-Aldrich (Fig. 3-2).

En el apartado 3.8.1 se detalla las dosis utilizadas en los tratamientos formulados en este trabajo.



Figura 3-2. Presentación de metales pesados objeto de estudio en este experimento

3.5. Riego

El riego de los cultivos se hizo mediante sistema de goteo (Fig. 3-3) con una mezcla de agua de un depósito cercano. En condiciones altas de lluvia, el depósito tiene aproximadamente 2/3 de agua de lluvia y 1/3 de agua de la red pública. En el apartado 3.7.3, se detalla la cantidad de agua que se aportó al cultivo.



Figura 3-3. Cultivo con riego por goteo en el invernadero de Agrópolis

3.6. Tratamientos del experimento

En este experimento se trabajó con 2 especies vegetales (lechuga y rábano) y 3 dosis de metales pesados formulados con Zn y Cu.

$$2 \text{ especies} \times 3 \text{ dosis (Zn y Cu)} = 6 \text{ tratamientos con metales pesados}$$

3.7. Diseño del experimento

3.7.1. Dosificación de metales pesados

Para poder evaluar el efecto de metales pesados en las plantas, se trabajó con 3 dosis diferenciadas para cada uno de los metales pesados escogidos. La adición de estos metales se hace de forma conjunta, es decir, que en cada contenedor habrá una mezcla de ambos (Zn + Cu).

El fango que se usa como fertilizante en este estudio ya tiene de por sí cierta cantidad de metales pesados (Tabla 3-2). Por este motivo, se decide trabajar con una dosis control sin añadir metales pesados (D0), y dosis media (D2) y dosis alta (D4) añadiendo cantidades extra de Zn y Cu:

- D0 → dosis control, sin adición extra de metales pesados.
- D2 → dosis media, se añade un extra de 11,221 mg Zn/L y 3,412 mg Cu/L.
- D4 → dosis alta, se añade un extra de 33,592 mg Zn/L y 10,238 mg Cu/L.

En la tabla 3-3, se detalla la concentración final (mg/L) de Zn y Cu añadida a cada contenedor dependiendo de la dosis definida.

Tabla 3-3. Concentración de metales pesados añadidos a cada contenedor dependiendo de la dosis		
Dosis	Zn (mg/L)	Cu (mg/L)
D0	4,194	1,440
D2	15,415	4,852
D4	37,786	11,678

3.7.2. Montaje y distribución

El experimento se lleva a cabo en el invernadero próximo a la parcela de la cual se extrae el suelo en las instalaciones de Agrópolis de la UPC, ubicada en Camí de les Filipines 110 (longitud 2°03 E, latitud 41°17 N) en la localidad de Viladecans.

Tal y como ya se ha indicado anteriormente, se lleva a cabo el experimento con 2 especies vegetales, 3 dosis diferentes de 2 metales pesados, y 5 réplicas de cada tratamiento. En total salen 30 individuos y contenedores (15 de lechuga y 15 de rábano).

A continuación se detalla el procedimiento de montaje similar al utilizado por Hurtado (2017):

1. Limpieza y enumeración de todos los contenedores.
2. Sorteo aleatorio para asignar a cada contenedor un determinado tratamiento y repetición (Tabla 3-4).
3. Se añaden pegatinas de colores para identificar rápidamente cada contenedor según tratamiento establecido.
4. Colocación de un filtro en la parte inferior del contenedor (en el cuello de la botella) para evitar que se salga el suelo.
5. Mezcla de suelo, arena y fertilizante.
6. Colocación de la mezcla de suelo-fango en cada contenedor y posterior ubicación en soporte.
7. Trasplante de lechugas y siembra de 3-4 semillas de rábano/contenedor.
8. Adición conjunta de metales pesados (Zn + Cu) de forma superficial según dosis establecida.
9. Colocación de los recipientes que recogen el agua de drenaje de cada contenedor.
10. Y por último, puesta del sistema de riego por goteo en cada contenedor vigilando no tocar las plantas o semillas (Fig. 3-4).



Figura 3-4. (Izquierda) Planta de lechuga y (derecha) semillas de rábano con gotero al inicio del experimento

Tabla 3-4. Sorteo aleatorio del número de contenedor por dosis y especie vegetal

Dosis	Lechuga	Rábano
D0	18 – 2 – 19 – 12 – 7	25 – 6 – 24 – 4 – 16
D2	11 – 10 – 8 – 5 – 20	3 – 17 – 21 – 28 – 14
D4	9 – 30 – 15 – 22 – 29	26 – 13 – 27 – 23 – 1

En la figura 3-5 se puede ver la instalación experimental resultante una vez finalizado el montaje.



Figura 3-5. Cultivo experimental en invernadero la primera semana

3.7.3. Duración y condiciones de cultivo

El experimento tiene una duración de 36 días con rábano y 57 días con lechuga. Así, la fecha de inicio para ambos fue el 04/03/19, y finalizaron el 08/04/19 y 29/04/19, rábano y lechuga respectivamente (Tabla 3-5).

En cuanto a rábano, la siembra de semillas se realiza el día 04/03/19 (4-5 semillas/contenedor) pero se espera hasta el 18/03/19 para empezar a medir las variables de crecimiento (ya que este día sólo se dejó 1 planta/contenedor de las semillas que habían germinado).

Tabla 3-5. Duración de cultivo experimental de cada especie vegetal

Lechuga		Rábano	
Semana 0 →	04/03/2019	Siembra de semillas →	04/03/2019
Semana 1 →	11/03/2019	Semana 0 →	18/03/2019
Semana 2 →	18/03/2019	Semana 1 →	25/03/2019
Semana 3 →	25/03/2019	Semana 2 →	01/04/2019
Semana 4 →	01/04/2019	Semana 3 →	08/04/2019
Semana 5 →	08/04/2019		
Semana 6 →	16/04/2019		
Semana 7 →	23/04/2019		
Semana 8 →	29/04/2019		

El riego diario se programó para que empezara a las 9:00 am cada día, y en el caso de doble frecuencia, ésta segunda se programó a las 3:00 pm. La cantidad de agua aportada a cada planta fue de 33,33 mL/minuto. En la tabla 3-6 se detallan las condiciones de riego establecidas para el experimento.

Tabla 3-6. Duración y condiciones de riego

Fecha	Días	Duración (min/sesión)	Frecuencia (/día)	Agua total (mL/día)
04/03/18 - 08/03/19	5	3	1	99,99
09/03/19 - 01/04/19	24	2	1	66,66
02/04/19 - 29/04/19	28 *	4	2	266,64

* En rábano fueron 7 días porqué se cosecho antes, el 08/04/19

El invernadero tiene un sistema de calefacción y aireación para mantener la temperatura lo más constante posible. Este sistema, se compone de calefactores y apertura/cierre de las ventanas de cristal de la nave. La temperatura media registrada fue de 22 °C.

A continuación, en la figura 3-6 se muestra la ubicación final de cada contenedor y planta según sorteo aleatorio.

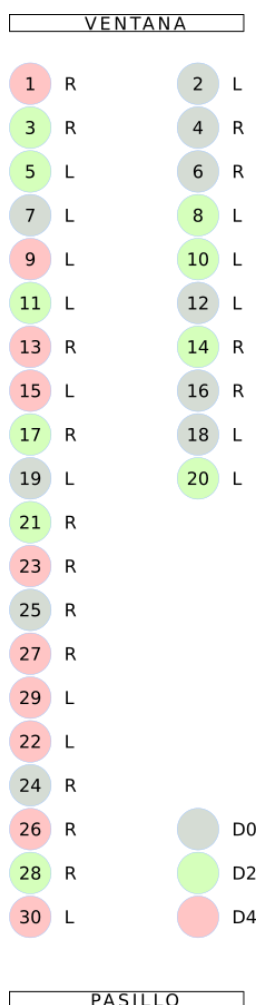


Figura 3-6. Esquema gráfico de la distribución aleatoria por especie vegetal y dosis de metales pesados añadidos. A la derecha de cada casilla se indica la especie vegetal L y R, lechuga y rábano respectivamente. (D0: dosis control; D2: dosis media; D4: dosis alta)

3.8. Determinación de biomasa

Para estimar la biomasa de las plantas se determinó el peso fresco, peso seco y humedad (Eq. 3-1) de diferentes partes de la planta. En el caso de la lechuga, se trabajó con 1/4 del total de las hojas (parte aérea), y en el caso del rábano, se trabajó con todas las hojas (parte aérea) y 1/4 del bulbo de la planta (parte subterránea).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso fresco}(g) - \text{Peso seco}(g)}{\text{Peso fresco}(g)} \cdot 100 \quad (3-1)$$

Los investigadores del IDAEA-CSIC necesitaban tener la mayor cantidad de material vegetal, parte aérea de lechugas y parte subterránea de rábanos, para realizar sus analíticas para determinar los metales pesados de la biomasa.

El peso fresco de cada muestra se toma en el momento de la cosecha utilizando una balanza Sartorius de 0,001 g de resolución y $\pm 0,0005$ g de exactitud. Una vez son identificadas correctamente las muestras, se llevan al laboratorio de Producción Vegetal de ESAB para ponerlas en bandeja de aluminio y en estufa a 80 °C hasta obtener peso constante (Fig. 3-7). El peso seco se determinó con una balanza Scaltec de 0,0001 g de resolución y $\pm 0,00005$ g de exactitud.



Figura 3-7. (A) Muestras de rábano correctamente etiquetadas, (B) hojas de rábano identificadas para desecar en estufa a 80 °C, y (C) hojas de rábano después de estar en estufa durante 2 días

3.9. Crecimiento vegetal

Para ver la evolución del crecimiento de las plantas se observaron los siguientes parámetros: (a) número de hojas y (b) medida de hoja más larga. Se obtuvieron datos durante 9 semanas y 4 semanas, lechuga y rábano respectivamente.

La recopilación de datos es inferior en el caso del rábano porque decidimos esperar hasta que la planta germinara para descartar los brotes “innecesarios” y dejar sólo uno. Además, el ciclo de cultivo del rábano es inferior que el ciclo de cultivo de la lechuga. Así, los datos de rábano son a partir de 15 días desde la siembra de semillas y finalizan en la cuarta semana desde el inicio de toma de datos (Fig. 3-8).



Figura 3-8. (Izquierda) Semillas de rábano sembradas el primer día de experimento, (Centro) brotes de rábano al cabo de 2 semanas de la siembra, y (Derecha) planta de rábano en el momento de la cosecha

a) Número de hojas

Se cuentan las hojas desarrolladas tanto de lechuga como rábano. Para lechuga, el método más efectivo para contar es en forma de espiral empezando desde el centro de la planta y en dirección hacia el exterior de ésta.

En lechuga, a partir de la semana 3, las hojas que presentan un tamaño inferior a 4 cm de longitud son descartadas como dato ese día. También las hojas que se sequen al inicio del experimento no se tienen en cuenta como dato.

Los cotiledones se descartan en ambas especies para esta medida.

b) Longitud de hoja más larga

Se miden las hojas exteriores de cada planta para determinar cual tiene mayor longitud. Para ello, se utiliza una cinta métrica flexible para medir desde la base del tallo hasta la punta de la hoja. Hace falta hacer 2-3 medidas en cada planta para determinar la hoja más larga cada día.

3.10.Determinación de lípidos y carbohidratos

El análisis de carbohidratos y lípidos que se detalla a continuación, se lleva a cabo en las instalaciones del IDAEA-CSIC después de haber cultivado lechugas y rábanos.

Las muestras de lechuga y rábano con las que se trabajó en este apartado se mantuvieron en congelación desde el día que fueron cosechadas y llevadas al laboratorio del IDAEA-CSIC.

Para lechuga, se trabaja con la parte aérea de la planta (hojas) y para rábano, en este caso, con la parte subterránea de la planta (bulbo).

Hay ligeras variaciones en el método que se detalla a continuación y que fue descrito por Margenat (2018) en su tesis doctoral.

a) Preparación y extracción de lípidos y carbohidratos

En primer lugar, se ponen 3 g (peso fresco) de material vegetal troceado en un tubo Falcon™ para desecarlo a 105 °C en estufa durante 24 h; después se añaden 15 mL de etanol/hexano (1:1, v/v); después la muestra se somete a vibraciones sonoras durante 15 min y se centrifuga a 2500 rpm durante 15 min; entonces se utiliza un filtro de 0,22 µm de nylon para filtrar el sobrenadante a otro tubo de vidrio (Fig. 3-9) previamente pesado; y se seca el solvente con nitrógeno gas para finalmente pesar el filtro y el tubo. El contenido del filtro y el tubo se denominan carbohidratos y lípidos, respectivamente (Fig. 3-10).

En el caso del rábano, se empieza con 1 g (peso fresco) y 5 mL de etanol/hexano (1:1, v/v), y a partir de aquí se sigue el mismo proceso anterior descrito.



Figura 3-9. Tubos de vidrio enumerados para ser pesados en balanza analítica

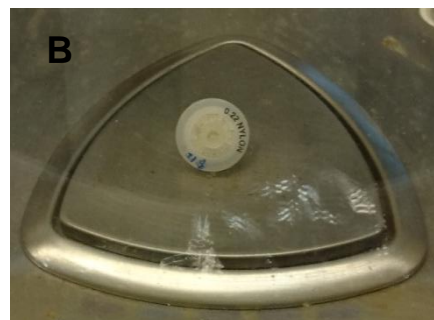
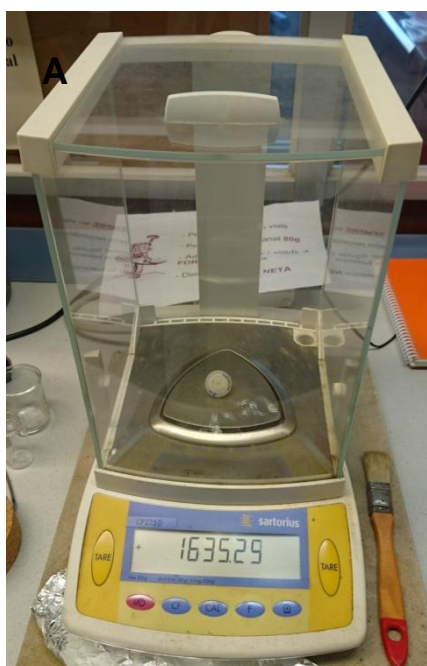


Figura 3-10. (A) Peso de filtro de nylon en balanza analítica con resolución de 0,01 mg y exactitud $\pm 0,005$ mg, y (B) ampliación de imagen

b) Cuantificación de lípidos y carbohidratos

A continuación, se detallan las ecuaciones (3-2 y 3-3) necesarias para determinar el contenido de lípidos y carbohidratos en diferentes muestras de material vegetal:

$$\% \text{Lípidos} = \frac{\text{Peso final tubo de vidrio}(mg) - \text{Peso inicial tubo de vidrio}(mg)}{\text{Peso fresco muestra inicial}(mg)} \cdot 100 \quad (3-2)$$

$$\% \text{Carbohidratos} = \frac{\text{Peso final filtro}(mg) - \text{Peso inicial filtro}(mg)}{\text{Peso fresco muestra inicial}(mg)} \cdot 100 \quad (3-3)$$

c) Adaptación del método empleado

Como ya se mencionó al principio de este apartado, los investigadores del IDAEA-CSIC también estaban realizando experimentación con los cultivos objeto de este trabajo. Aunque sus resultados no influyen en la ejecución del mismo.

En este método, se utilizaron tubos Falcon™ en lugar de tubos de vidrio para desecar la muestra fresca y someterla a vibraciones sonoras. También se utilizó una cantidad inferior de muestra en el caso de rábano (1 g peso fresco) debido a que investigadores del IDAEA-CSIC necesitan disponer del máximo material posible para analizar metales pesados en planta.

3.11. Determinación de clorofilas

Para estimar las clorofilas a, b y totales de las plantas se utilizó el medidor OPTI-SCIENCES CCM-200 *plus* (Fig. 3-11). Este aparato mide la transmitancia en 2 longitudes de onda (653 nm y 931 nm) y calcula el CCI (*chlorophyll content index*) (Eq. 3-4) como valor relativo de clorofila. La exactitud que presenta es de $\pm 5\%$ del valor relativo.

Se hacen medidas por triplicado de 3 zonas diferenciadas de la hoja: exterior, media, e interior. Se obtienen 9 mediciones por planta en un total de 15 lechugas. En el caso del rábano, al tener las hojas más pequeñas, se hacen 3 mediciones en dos zonas: exterior e interior. Se obtienen 6 mediciones por planta en un total de 15 rábanos.





Figura 3-11. Medidor OPTI-SCIENCES CCM-200 plus utilizado para medir valor relativo de clorofila

El valor absoluto de clorofila en cada planta se consigue mediante las líneas de tendencia que obtenemos de relacionar el CCI con la cantidad de clorofilas extraídas (mg/cm^2) de una muestra. En el caso de la lechuga, utilizamos las líneas de tendencia (Eq. 3-5, 3-6 y 3-7) obtenidas por Nadal (2015) y con unidades (mg/cm^2) donde (x) representa el valor de CCI.

$$CCI = \frac{\% \text{ transmitancia a } 931\text{nm}}{\% \text{ transmitancia a } 653\text{nm}} \quad (3-4)$$

$$\text{Clorofilas a} \rightarrow y = 0,009 \cdot \ln(x) - 0,0006 \quad (3-5)$$

$$R^2 = 0,856$$

$$\text{Clorofilas b} \rightarrow y = 0,0026 \cdot \ln(x) - 0,0001 \quad (3-6)$$

$$R^2 = 0,8383$$

$$\text{Clorofilas totales} \rightarrow y = 0,0116 \cdot \ln(x) - 0,007 \quad (3-7)$$

$$R^2 = 0,8541$$

En el caso de rábanos, las líneas de tendencia, que relacionan los valores CCI con la cantidad extraída de clorofilas en una muestra, las obtenemos en un análisis posterior a este cultivo experimental. Se trabaja conjuntamente con otro estudiante de ESAB que está realizando experimentación con rábanos cultivados en parcela.

A continuación, se detalla el proceso de extracción y cuantificación de clorofilas en muestras de hoja de rábano.

Extracción de clorofilas

Para la extracción de clorofilas en muestras de rábano, se seleccionan las hojas óptimas (coloración verde, sin partes secas, sin signos de ataque de plagas) de individuos adultos. Se mide el CCI de 30 plantas y se marca con un rotulador la superficie donde se hace la medición.

Una vez recortadas estas muestras (30 en total), se identifican y llevan al laboratorio de la ESAB para realizar la extracción de clorofilas con 5 mL de N,N'-dimetilformamida (DMF) en tubos de vidrio y área foliar aproximada de 1,77 cm². Estos tubos se mantienen en condiciones de oscuridad y refrigerados a 4 °C durante 48 h (Inskeep & Bloom, 1985).

Cuantificación de clorofilas extraídas

Una vez extraídas las clorofilas, se procede a medir la absorbancia de cada muestra a 647 nm y 664,5 nm con un espectrofotómetro. Las clorofilas (a, b y totales) se pueden calcular con los coeficientes de Inskeep & Bloom (1985) (Tabla 3-7).

Tabla 3-7. Ecuaciones simultaneas para cuantificar clorofilas en tejido vegetal a partir de absorbancias y en cubeta de 1 cm

Solvente	Ecuaciones para concentración de clorofila (mg/L)
DMF	$[Clorofilas\ a] = 12,70 \cdot A_{664,5} - 2,79 \cdot A_{647}$
	$[Clorofilas\ b] = 20,70 \cdot A_{647} - 4,62 \cdot A_{664,5}$
	$[Clorofilas\ total] = 17,90 \cdot A_{647} - 8,08 \cdot A_{664,5}$



3.12.Tratamiento estadístico

Se realizó un tratamiento estadístico de los resultados estimados de biomasa de cada especie según correspondiera (parte aérea o subterránea) y contenido de lípidos y carbohidratos. También se analizaron los resultados de clorofilas, y longitud de hoja más larga, número de hojas y diámetro medio.

Se utilizó el programa Minitab ® 18 para hacer un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el método de Tukey para analizar los promedios cuando había igualdad de varianzas, y por el contrario se utilizó el método de Games-Howell para analizar los promedios cuando no había igualdad de las varianzas. Se estableció un nivel de significancia del 5% para observar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos dependiendo de la dosis utilizada.

Todas las figuras del apartado de resultados representan el valor promedio \pm intervalo de confianza del 95%.

Resultados

4. Resultados

4.1. Biomasa

4.1.1. Biomasa de lechuga

De la lechuga se analizó el peso fresco y peso seco de 1/4 de la parte aérea. Se puede observar una ligera tendencia superior, aunque no significativa, de las plantas con dosis alta (D4) en cuanto a peso fresco y peso seco se refiere (Fig. 4-1). El peso fresco de todas las muestras tiene un promedio superior a 50 g. En cuanto a la humedad, los resultados son similares en todos los casos, aproximadamente 90 %.

El análisis estadístico denotó que no se encuentran diferencias significativas, valor $p > 0,1$ en todos los casos (Tabla 4-1).

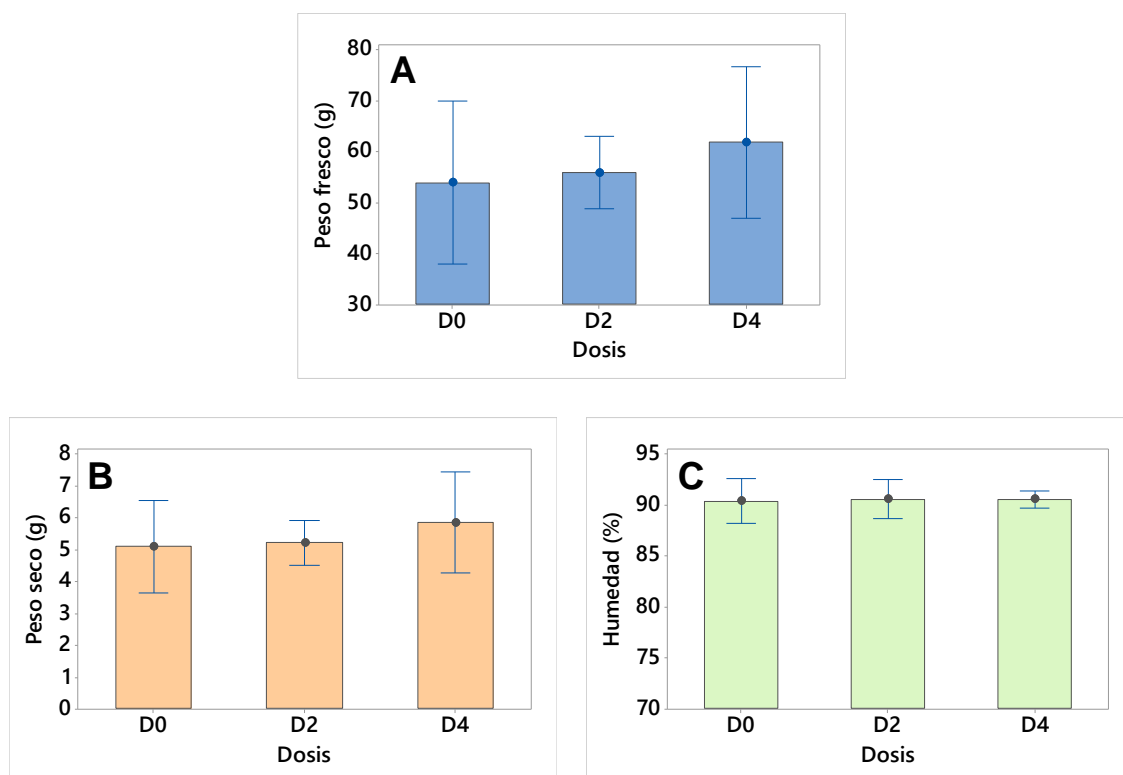


Figura 4-1. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte aérea de lechuga según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-1. Resultados de la determinación de biomasa en lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia de 5%

Dosis	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
D0	53,96 \pm 12,85 a	5,102 \pm 1,174 a	90,4 \pm 1,9 a
D2	55,92 \pm 5,72 a	5,214 \pm 0,572 a	90,6 \pm 1,5 a
D4	61,88 \pm 12,00 a	5,856 \pm 1,271 a	90,6 \pm 0,7 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.1.2. Biomasa de rábano

En rábano se obtuvieron resultados de peso fresco, peso seco y humedad de diferentes partes de la planta (Tabla 4-2). En primer lugar, se determina la biomasa de las hojas (parte aérea), y en segundo lugar la biomasa de 1/4 del bulbo (parte subterránea).

Parte aérea

El peso fresco medio de todas las plantas es de 13 g aproximadamente (Fig. 4-2). En cuanto a peso seco, el promedio de todas las muestras es superior a 1,2 g y no presentan diferencias significativas. La humedad media de todas las muestras es siempre inferior al 90 %. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas, según análisis estadístico, en cuanto a peso fresco, peso seco y humedad se refiere (Tabla 4-2).

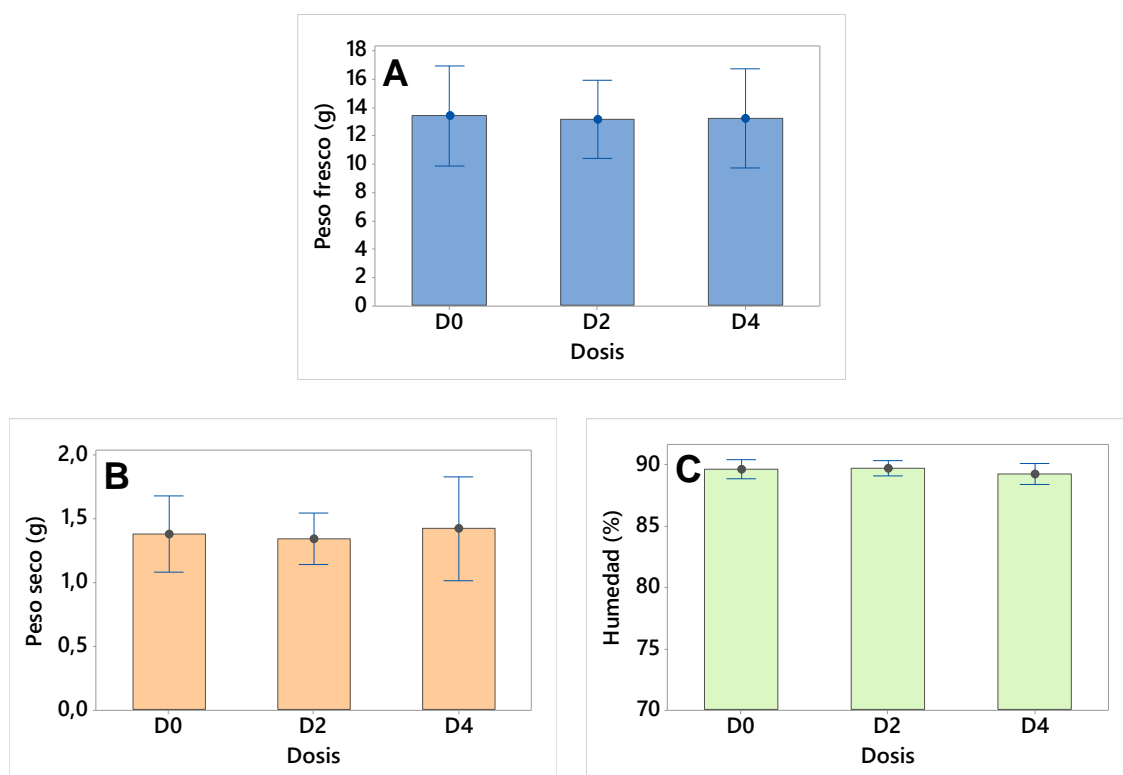


Figura 4-2. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte aérea de rábano según dosis aplicada de metales pesados

Parte subterránea

Se observa que plantas con dosis D2 tienen un valor de peso fresco inferior a 10 g (Fig. 4-3). Para el peso seco, los rábanos tratados con dosis D0 y D4 presentan valores próximos a 0,8 g, y los rábanos con dosis D2 un valor inferior a 0,6 g. Aunque las diferencias de peso seco no son significativas ($p=0,051$), el valor p se aproxima al límite de la significancia cuando trabajamos con un nivel de confianza de 95%. En cuanto a humedad, el promedio de todas las dosis se sitúa alrededor del 93 % y no presentan diferencias (Tabla 4-2). El valor $p>0,1$ en la humedad de las muestras no denota una diferencia significativa.

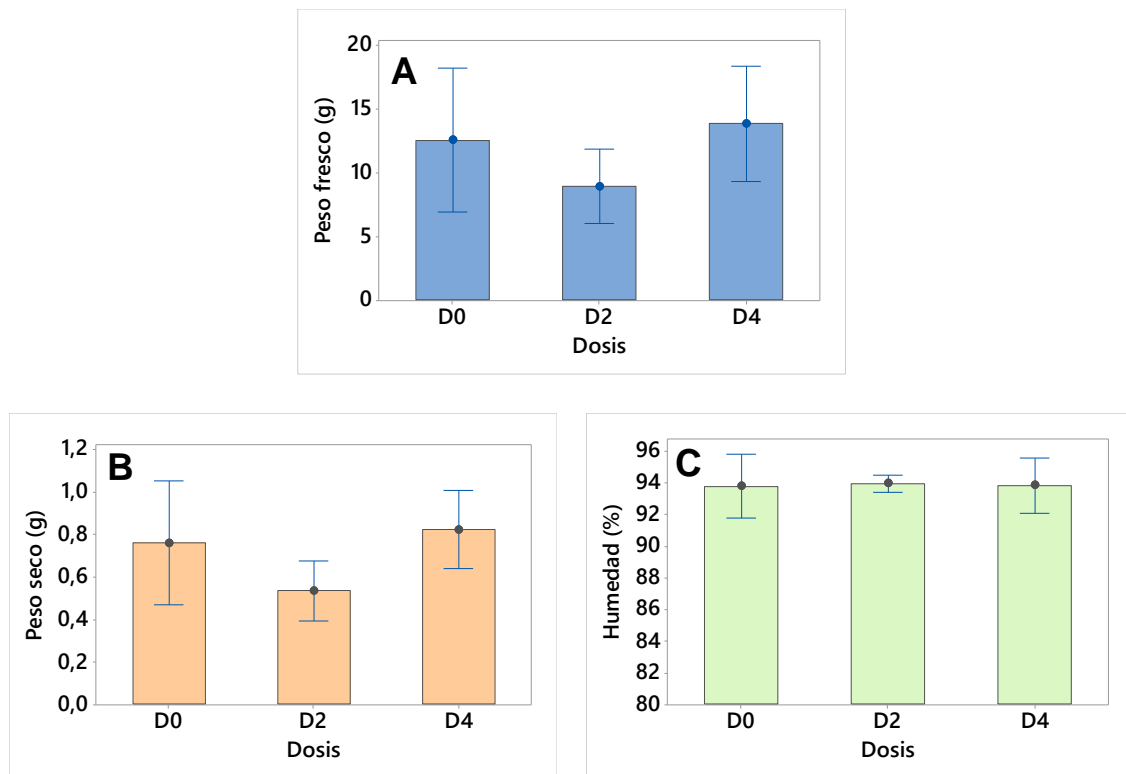


Figura 4-3. Resultados de (A) peso fresco, (B) peso seco y (C) humedad de la parte subterránea de rábano según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-2. Resultados de la determinación de biomasa de hojas y bulbo en rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia de 5%

Dosis	Parte aérea			Parte subterránea		
	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
D0	13,43 \pm 2,84 a	1,381 \pm 0,243 a	89,6 \pm 0,6 a	12,58 \pm 4,54 a	0,759 \pm 0,234 a	93,8 \pm 1,6 a
D2	13,15 \pm 2,23 a	1,342 \pm 0,164 a	89,7 \pm 0,5 a	8,94 \pm 2,35 a	0,535 \pm 0,113 a	94,0 \pm 0,4 a
D4	13,25 \pm 2,83 a	1,423 \pm 0,327 a	89,3 \pm 0,7 a	13,86 \pm 3,66 a	0,824 \pm 0,148 a	93,9 \pm 1,4 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.2. Crecimiento vegetal

Se contaron y midieron hojas de lechuga y rábano cada semana. En rábano, durante el tiempo que duró el cultivo ninguna hoja se secó. Contrariamente en lechuga, algunas hojas se secaron (Fig. 4-4) durante las primeras semanas y por lo tanto se descartaron como dato.



Figura 4-4. Plantas de lechuga que presentan hojas secas

4.2.1. Longitud y número de hojas en lechuga.

Las plantas con dosis media (D2) son las que tienen longitudes de hoja ligeramente superiores a las otras plantas durante todo el experimento, siendo inferior este valor únicamente en la semana 2, semana 3 y semana 4 (Fig. 4-5-A). Aunque esta diferencia en ningún caso llega a ser superior a 1 cm.

Respecto al número total de hojas, se observa que las plantas de dosis D0 y dosis D2 presentan valores similares desde el inicio del experimento hasta la semana 5, donde las plantas con dosis D0 empiezan tener mayor número de hojas. También se aprecia que las plantas con dosis D4 tienen los valores más bajos desde la semana 3 hasta la semana 7, donde superan a plantas de dosis D2. En la recta final del cultivo, las plantas con dosis D0 tienen valores superiores en la semana 6 y semana 7 pero igualándose a las plantas D4 en la última semana (Fig. 4-5-B).

El tratamiento estadístico de resultados de este apartado (Tabla 4-3), tan sólo se hizo de los datos recogidos de la última semana (semana 8).

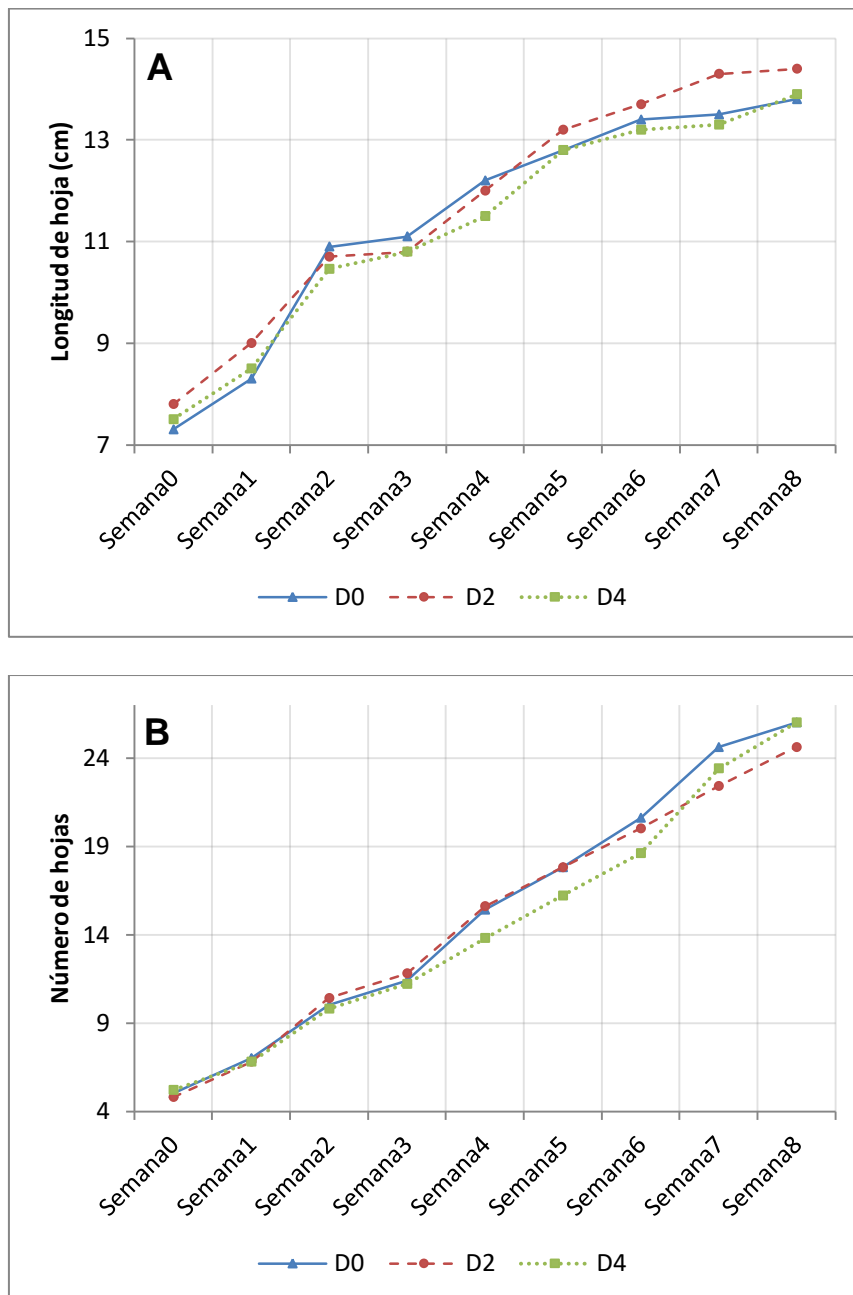


Figura 4-5. Representación de la evolución de (A) longitud de hoja más larga y (B) número total de hojas en lechuga según dosis aplicada de metales pesados

Las plantas de lechuga con dosis D2 presentaron una longitud de hoja de 14,4 cm. Los resultados obtenidos de longitud de hoja, en general, son superiores a 13 g en todas las dosis de metales sin diferencias significativas ($p=0,099$) (Fig. 4-6). Respecto al número total de hojas, las plantas con dosis D0 y D4 presentaron valores similares de 26 hojas, y de 24,6 hojas en plantas tratadas con dosis D2. Las diferencias no son significativas para ninguno de los dos parámetros (Tabla 4-3).

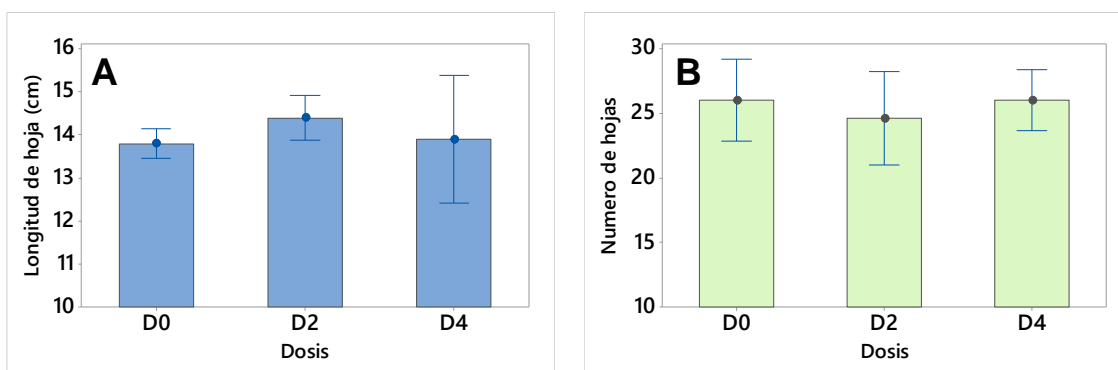


Figura 4-6. Resultados de (A) longitud de hojas más larga (cm) y (B) número total de hojas en lechuga según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-3. Resultados de la determinación de hoja más larga y número de hojas totales en cultivo de lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valores promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Longitud de hoja más larga (cm)	Número total de hojas
D0	13,80 \pm 0,27 a	26,00 \pm 2,55 a
D2	14,40 \pm 0,42 a	24,60 \pm 2,88 a
D4	13,90 \pm 1,19 a	26,00 \pm 1,87 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.2.2. Longitud y número de hojas en rábano

En cuanto a longitud de la hoja más larga, podemos observar que las plantas con dosis D0 tienen un valor promedio superior a las plantas de dosis D2 durante las 3 primeras semanas (Fig. 4-7-A). En la última semana de cultivo, se aprecia que las plantas de dosis media (D2) y alta (D4) tienen longitudes de hoja más largas que plantas con dosis nula (D0) aunque no presenta una diferencia significativa.

Los rábanos tratados con dosis D0, presentan un mayor número de hojas durante todo el periodo (semana 0 – semana 3) respecto a plantas tratadas con dosis D0 y D4 (Fig. 4-7-B). Así mismo, se aprecia que plantas con dosis D2 y D4 tienen valores similares desde la semana 1 hasta la semana 3 que marca el fin del cultivo y día de cosecha.

El tratamiento estadístico de resultados de este apartado (Tabla 4-4), tan sólo se hizo de los datos recogidos de la última semana (semana 3).

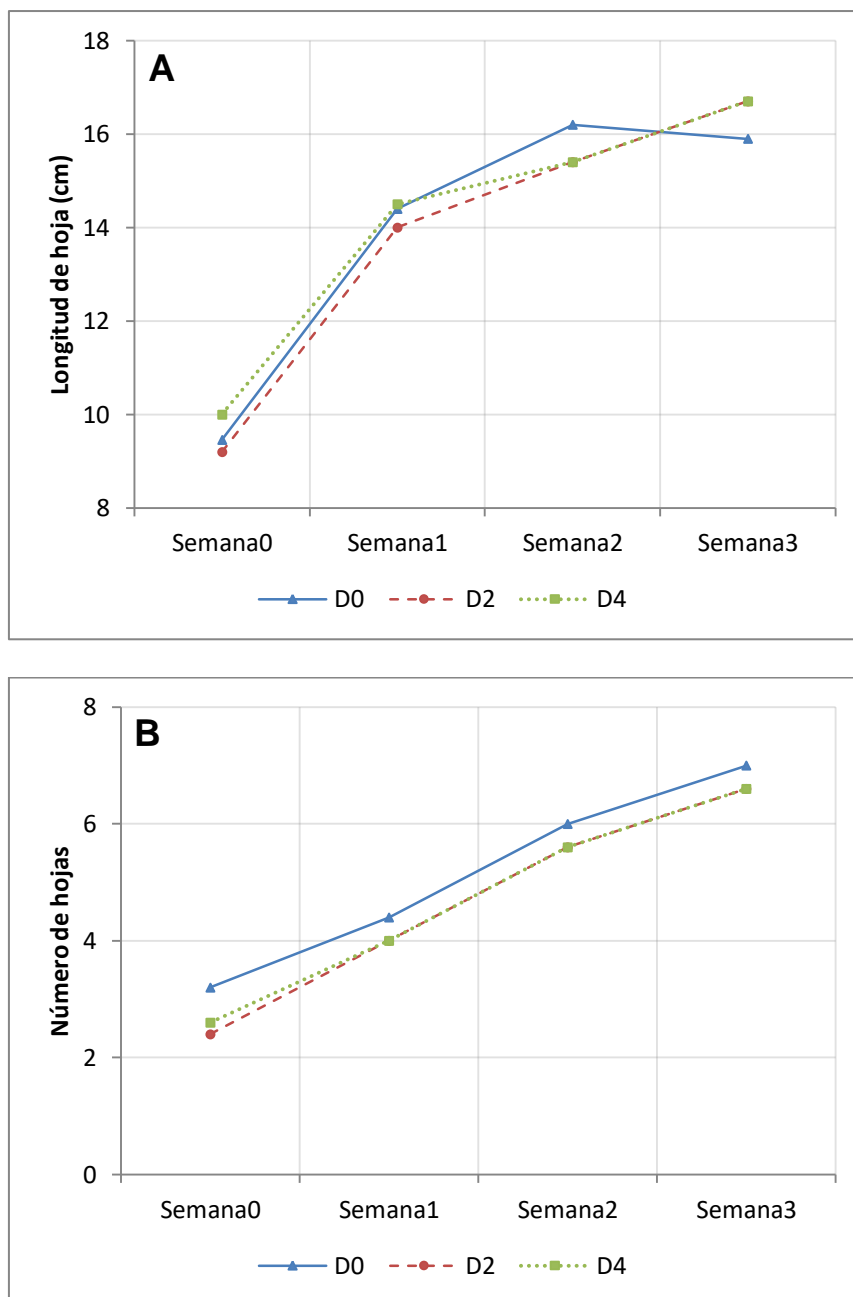


Figura 4-7. Representación de la evolución de (A) longitud de hoja más larga y (B) número total de hojas en rábano según dosis aplicada de metales pesados

A continuación, observamos que los rábanos tratados con diferentes dosis (D0, D2 y D4) no resultan en un aumento o deficiencia del crecimiento. (Fig. 4-8). Los rábanos tratados con dosis D0, tienen un valor promedio de 16 cm de longitud de hoja. Este valor es inferior a los 16,7 cm que tienen plantas con dosis D2 y D4, pero no resulta en una diferencia significativa. Respecto al número de hojas, los rábanos tienen un promedio superior a 6 hojas en todos los tratamientos. No se encuentran diferencias significativas (Tabla 4-4).

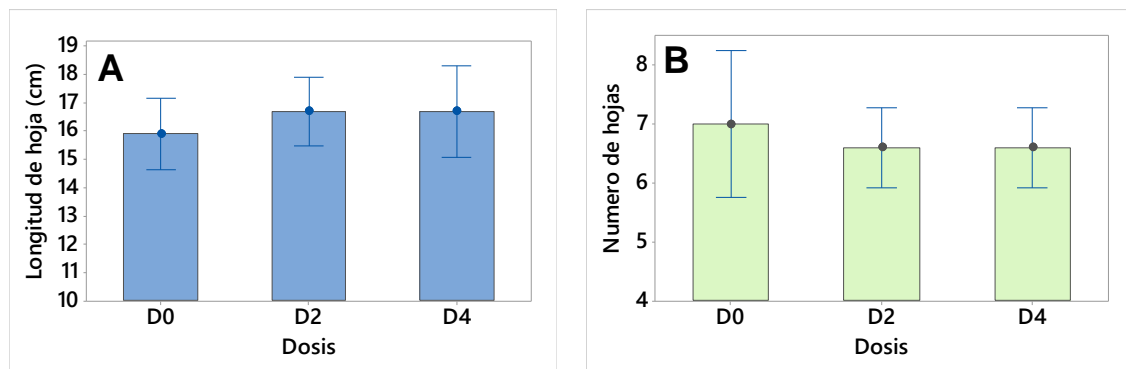


Figura 4-8. Resultados de (A) longitud de hojas más larga (cm) y (B) número total de hojas en rábano según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-4. Resultados de la determinación de hoja más larga y número de hojas totales en cultivo de rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valores promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Longitud de hoja más larga (cm)	Número total de hojas
D0	15,90 \pm 1,03 a	7,00 \pm 1,00 a
D2	16,70 \pm 0,98 a	6,60 \pm 0,55 a
D4	16,70 \pm 1,3 a	6,60 \pm 0,55 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.3. Contenido de lípidos y carbohidratos

Lechuga

Las plantas tratadas con dosis D4 tienen un valor promedio de lípidos de 0,3356 %. Aunque las plantas con dosis D0 y D2 tienen un valor inferior a 0,3 %, esta no resulta ser una diferencia significativa ($p>0,05$). En cuanto a carbohidratos, observamos que los resultados de plantas ofrecen un valor aproximado de 0,05 % (Fig. 4-9). No obtenemos diferencias significativas ($p>0,05$) en contenido de lípidos y carbohidratos en muestras de lechuga (Tabla 4-5).

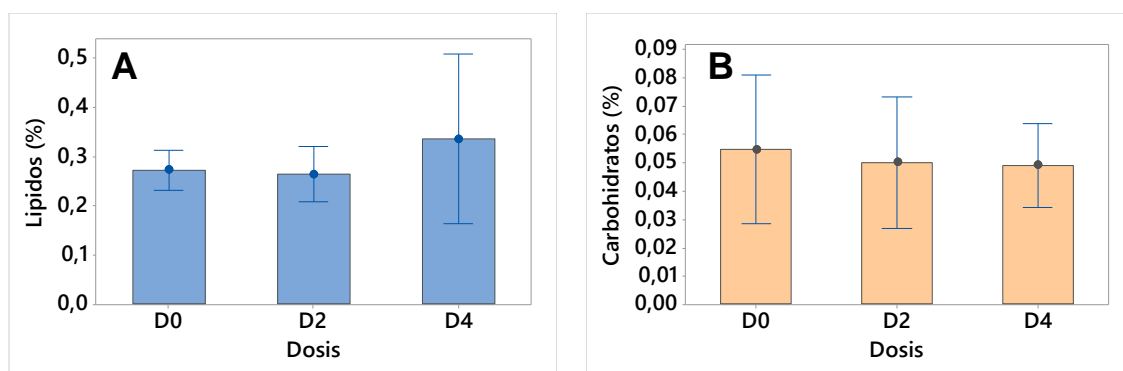


Figura 4-9. Contenido de (A) lípidos (%) y (B) carbohidratos (%) en lechuga según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-5. Resultados de la determinación de lípidos y carbohidratos en hojas de lechuga según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
D0	0,2725 \pm 0,0329 a	0,05467 \pm 0,02110 a
D2	0,2642 \pm 0,0445 a	0,05006 \pm 0,01878 a
D4	0,3356 \pm 0,1385 a	0,04906 \pm 0,01203 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Rábano

Las plantas de rábano tratadas con dosis D0 y D4 tienen un contenido de lípidos inferior al 0,10 % (Fig. 4-10-A). Y aunque las plantas con dosis D2 tienen un valor superior, esta diferencia no resulta ser significativa ($p>0,05$). Respecto a carbohidratos, se observa que el promedio general de las muestras se sitúa alrededor de 0,06 % (Fig. 4-10-B). En la tabla 4-6 se detalla la comparación de promedios de lípidos y carbohidratos. No se encuentran diferencias significativas en este apartado.

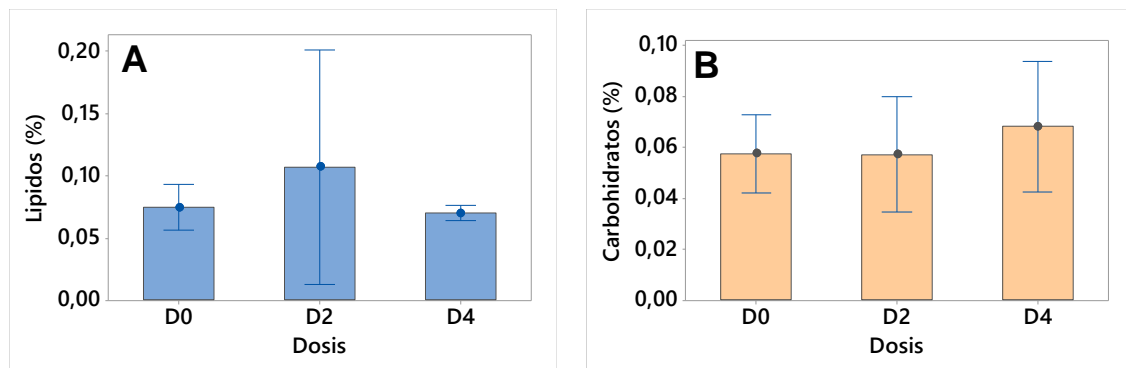


Figura 4-10. Contenido de (A) lípidos (%) y (B) carbohidratos (%) en rábano según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-6. Resultados de la determinación de lípidos y carbohidratos en bulbo de rábano según dosis aplicada de metales pesados. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
D0	0,0745 \pm 0,0148 a	0,0575 \pm 0,0124 a
D2	0,1069 \pm 0,0758 a	0,0573 \pm 0,0183 a
D4	0,0701 \pm 0,0049 a	0,0682 \pm 0,0208 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.4. Composición de clorofilas

4.4.1. Estimación de la composición de clorofilas en lechuga según dosis aplicada

En todos los casos, la cuantificación de clorofilas a, b y totales resulta en valores similares en plantas con diferentes dosis (D0, D2 y D4) alrededor de 0,015 mg/cm² para clorofilas a (Fig. 4-11). Para clorofilas b, el promedio de todas las muestras se sitúa con valores superiores a 0,004 mg/cm². El análisis estadístico de este apartado no revela diferencias significativas respecto al contenido de clorofilas en lechugas, valor $p > 0,05$ en todos los casos (Tabla 4-7).

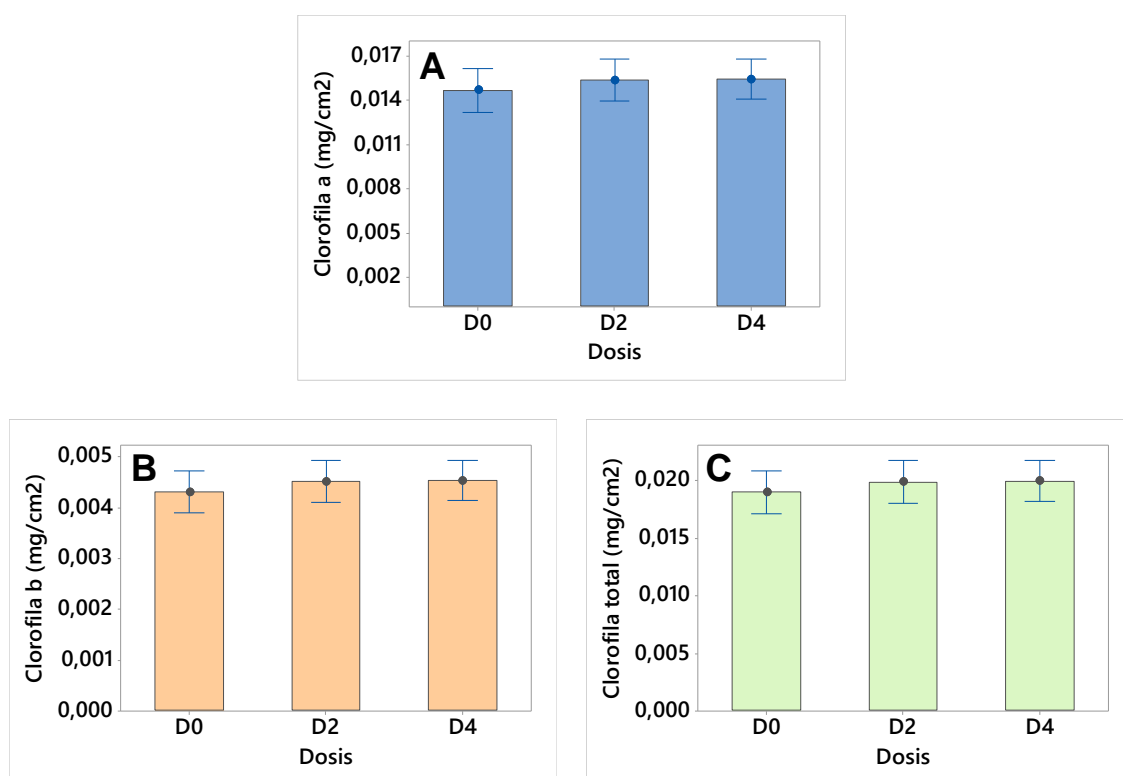


Figura 4-11. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm²), (B) clorofilas b (mg/cm²) y (C) clorofilas totales (mg/cm²) en lechuga según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-7. Resultados de la determinación de clorofilas a, b y totales en lechuga según la dosis de metales pesados añadida. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas a (mg/cm ²)	Clorofilas b (mg/cm ²)	Clorofilas totales (mg/cm ²)
D0	0,01467 \pm 0,004864 a	0,00431 \pm 0,001405 a	0,01898 \pm 0,006269 a
D2	0,01537 \pm 0,004779 a	0,00451 \pm 0,001381 a	0,01988 \pm 0,006159 a
D4	0,01544 \pm 0,004503 a	0,00453 \pm 0,001301 a	0,01997 \pm 0,005804 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.4.2. Estimación de la composición de clorofilas en lechuga según posición de la hoja

A continuación, se observa que el contenido global de clorofilas, dependiendo del nivel en que se encuentra la hoja (exterior, medio e interior), disminuye a medida que la hoja está más al interior. Esta diferencia es casi el doble cuando se comparan nivel exterior e interior (Fig. 4-12). Según análisis estadístico, estas diferencias son significativas en todas las clorofilas a, b y totales ($P < 0,05$ en todos los casos).

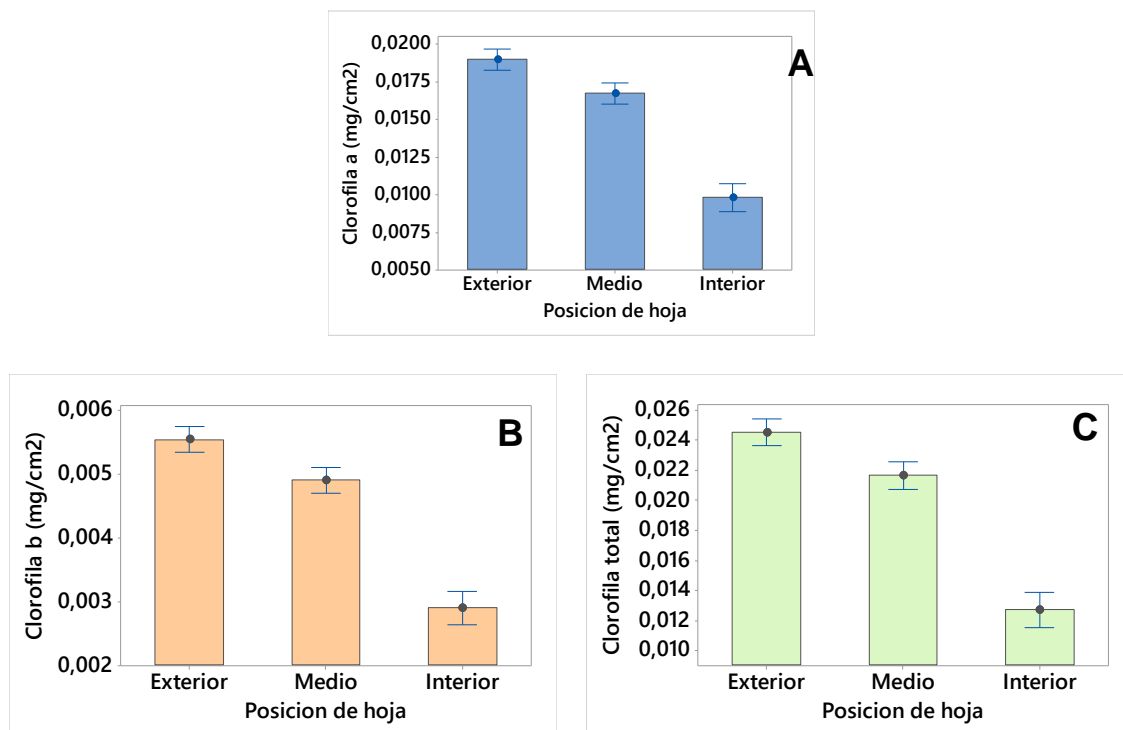


Figura 4-12. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm²), (B) clorofilas b (mg/cm²) y (C) clorofilas totales (mg/cm²) en lechuga según dosis aplicada y posición exterior

Las tablas 4-8, 4-9 y 4-10, muestran el contenido de clorofilas a, b y totales según nivel de la hoja y dosis de metales pesados. No se observan diferencias en contenido de clorofilas en diferentes niveles de hoja y dosis de metales.

Tabla 4-8. Resultados de la determinación de clorofilas a en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas a (mg/cm ²)		
	Exterior	Medio	Interior
D0	0,01851 \pm 0,00238 a	0,01635 \pm 0,00303 a	0,00914 \pm 0,00282 a
D2	0,01947 \pm 0,00189 a	0,01703 \pm 0,00179 a	0,00960 \pm 0,00287 a
D4	0,01888 \pm 0,00267 a	0,01681 \pm 0,00217 a	0,01062 \pm 0,00351 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 4-9. Resultados de la determinación de clorofilas b en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas b (mg/cm ²)		
	Exterior	Medio	Interior
D0	0,00542 \pm 0,00069 a	0,00480 \pm 0,00087 a	0,00272 \pm 0,00082 a
D2	0,00570 \pm 0,00055 a	0,00499 \pm 0,00052 a	0,00285 \pm 0,00083 a
D4	0,00553 \pm 0,00077 a	0,00493 \pm 0,00063 a	0,00314 \pm 0,00010 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 4-10. Resultados de la determinación de clorofilas totales en lechuga según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas totales (mg/cm ²)		
	Exterior	Medio	Interior
D0	0,02394 \pm 0,00306 a	0,02115 \pm 0,00390 a	0,01186 \pm 0,00364 a
D2	0,02518 \pm 0,00244 a	0,02202 \pm 0,00230 a	0,01244 \pm 0,00370 a
D4	0,02440 \pm 0,00344 a	0,02174 \pm 0,00279 a	0,01376 \pm 0,00452 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes

4.4.3. Estimación de la composición de clorofilas en rábano según dosis aplicada

A continuación, se detallan las ecuaciones (4-1, 4-2, y 4-3) de las líneas de tendencia obtenidas de relacionar el valor relativo de clorofila (CCI) (también (x) en las ecuaciones) y la cantidad de clorofila extraída del tejido vegetal (mg/cm²).

$$\text{Clorofilas a} \rightarrow y = 0,0154 \cdot \ln(x) - 0,0172 \quad R^2 = 0,8512 \quad (4-1)$$

$$\text{Clorofilas b} \rightarrow y = 0,0039 \cdot \ln(x) - 0,004 \quad R^2 = 0,6948 \quad (4-2)$$

$$\text{Clorofilas totales} \rightarrow y = 0,0193 \cdot \ln(x) - 0,0212 \quad R^2 = 0,8426 \quad (4-3)$$

Se aprecia que los resultados en contenido de clorofilas son inferiores en plantas con dosis media (D2) respecto a las otras plantas de dosis control y dosis alta, D0 y D4 respectivamente (Fig. 4-13). Plantas con dosis D0 y D4, tienen valores muy similares en la composición de las clorofilas a, b y totales con valores de 0,025; 0,007 y 0,031 mg/cm², respectivamente. Las plantas tratadas con dosis D2, resultan en valores de 0,020; 0,005 y 0,026 mg/cm² para clorofilas a, b y total, respectivamente. Estas diferencias resultan ser inferiores significativamente ($p=0,001$ en todos los contenidos de clorofilas) (Tabla 4-11).



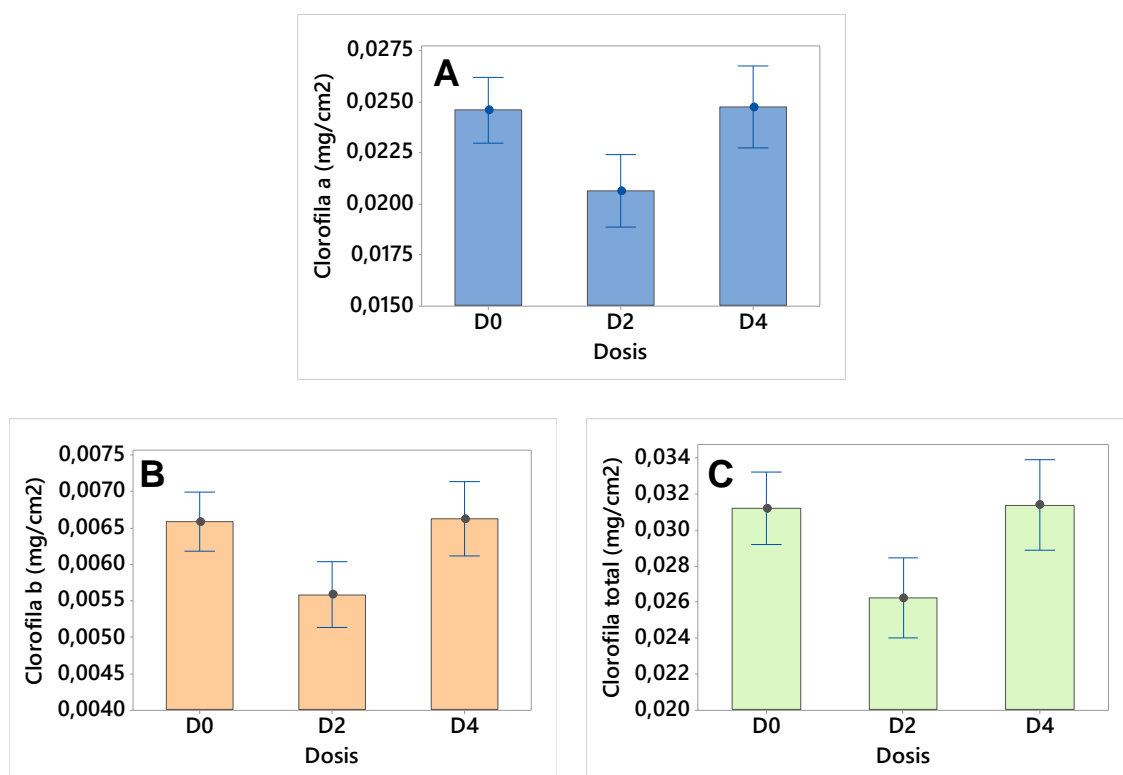


Figura 4-13. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm²), (B) clorofilas b (mg/cm²) y (C) clorofilas totales (mg/cm²) en rábano según dosis aplicada de metales pesados

Tabla 4-11. Resultados de la determinación de clorofilas a, b y totales en rábano según la dosis de metales pesados añadida. Valor promedio ± desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas a (mg/cm ²)	Clorofilas b (mg/cm ²)	Clorofilas totales (mg/cm ²)
D0	0,02460 ± 0,00429 a	0,00659 ± 0,00109 a	0,03119 ± 0,00538 a
D2	0,02063 ± 0,00479 b	0,00558 ± 0,00121 b	0,02621 ± 0,00600 b
D4	0,02476 ± 0,00536 a	0,00663 ± 0,00136 a	0,03138 ± 0,00672 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.4.4. Estimación de la composición de clorofilas en rábano según posición de la hoja

A continuación, se observa que el contenido global de clorofilas, dependiendo del nivel en que se encuentra la hoja (exterior e interior), disminuye a medida que la hoja se encuentra más en el interior (Fig. 4-12). Esta diferencia se da en todas las clorofilas (a, b y totales). Según análisis estadístico, estas diferencias son significativas en todas las clorofilas ($P < 0,001$ en todos los casos).

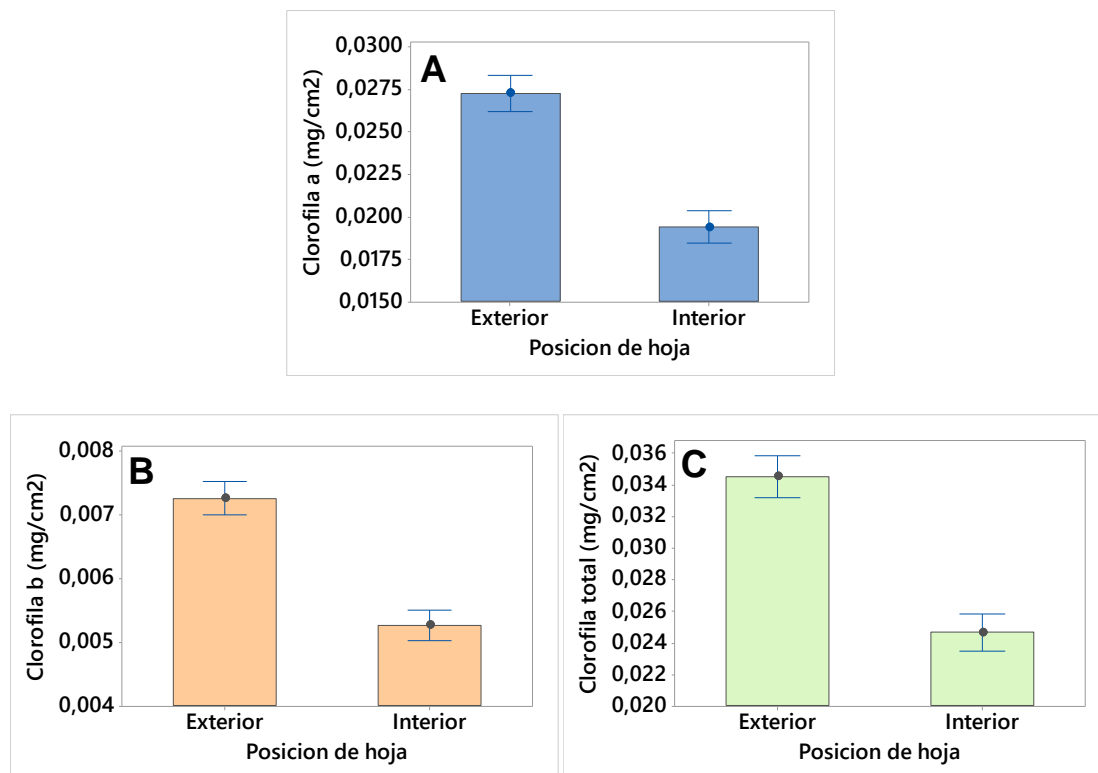


Figura 4-14. Resultados de (A) clorofilas a (mg/cm^2), (B) clorofilas b (mg/cm^2) y (C) clorofilas totales (mg/cm^2) en rábano según dosis aplicada y posición exterior

En las tablas 4-12, 4-13 y 4-14 se muestran los contenidos de clorofilas a, b y totales en plantas de rábano según posición de hoja y dosis de metales pesados. Se observa una disminución en plantas con dosis media (D2) respecto a plantas con dosis control (D0) y dosis alta (D4). Esta diferencia en contenido de clorofilas según tratamiento y posición de hoja es significativa en todos los casos, valor $p < 0,001$ ($P \leq 0,05$ diferencias significativas).

Tabla 4-12. Resultados de la determinación de clorofilas a en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas a (mg/cm ²)	
	Exterior	Interior
D0	0,02818 \pm 0,00219 a	0,02102 \pm 0,00242 a
D2	0,02433 \pm 0,00301 b	0,01694 \pm 0,00302 b
D4	0,02929 \pm 0,00311 a	0,02022 \pm 0,00242 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 4-13. Resultados de la determinación de clorofilas b en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas b (mg/cm ²)	
	Exterior	Interior
D0	0,00749 \pm 0,00056 a	0,00568 \pm 0,00061 a
D2	0,00652 \pm 0,00076 b	0,00465 \pm 0,00077 b
D4	0,00777 \pm 0,00079 a	0,00548 \pm 0,00061 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 4-14. Resultados de la determinación de clorofila total en rábano según la dosis de metales pesados añadida y posición en la hoja. Valor promedio \pm desviación estándar, y nivel de significancia del 5%

Dosis	Clorofilas totales (mg/cm ²)	
	Exterior	Interior
D0	0,03567 \pm 0,00274 a	0,02670 \pm 0,00303 a
D2	0,03085 \pm 0,00377 b	0,02158 \pm 0,00379 b
D4	0,03707 \pm 0,00389 a	0,02570 \pm 0,00303 a

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Discusión

5. Discusión

En este trabajo se pretendía evaluar una posible toxicidad provocada por la aplicación de dos metales pesados, Zn y Cu en diferentes concentraciones, en un cultivo de lechugas y rábanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo no muestran que las plantas de lechuga tuvieran síntomas aparentes de toxicidad. Se esperaba como efecto de estrés por metales pesados, la clorosis en las hojas de lechugas y rábanos, y un mayor grado de senescencia en la planta (Nagajyoti et al., 2010). El peso fresco y seco de las plantas de lechuga no se vio afectado considerablemente por la adición de metales pesados en diferentes dosis. Tampoco se obtuvieron resultados que mostraran una variación considerable en la longitud o número de hojas en plantas de lechuga debido a la contaminación del medio de crecimiento. La adición de fangos de depuradora supone un aporte un gran aporte de nutrientes como nitrógeno y materia orgánica (57,7 % s.m.s en el fertilizante utilizado), necesarios para que la planta se desarrolle de forma óptima. Jaray (2019) obtuvo que las plantas de lechuga fertilizadas con fangos de depuradora tenían una mayor biomasa que plantas tratadas con fertilizantes como purín deshidratado. Reichman (2002) menciona que el Cu del fango de depuradora es retenido en mayor proporción en el suelo que el Cu aplicado como sulfato. Esto puede indicar que en nuestro trabajo no todo el Cu (apartado 3.7.1) estaba disponible para la planta y por lo tanto no presenta una concentración tóxica para las lechugas.

La toxicidad que puede provocar un metal pesado depende de la biodisponibilidad que tiene en el suelo. Así, factores como pH, materia orgánica, y textura hacen que los metales interactúen en su forma iónica con la raíz de la planta. A pH bajo, la disponibilidad de metales pesados en el suelo es mayor. El suelo que se utilizó en este trabajo tenía un pH de 8,48 y, en investigaciones consultadas anteriormente, este es un valor más bien ácido con un rango 5-7 (Ebbs y Kochian, 1997; Luo y Rimmer, 1995; Naz et al., 2015). En cuanto a materia orgánica, a medida que ésta aumenta en el suelo menor es la biodisponibilidad de los metales pesados para la planta debido a que la adsorción de iones metálicos en el suelo es mayor (Gupta et al., 2019). Esto puede indicar que la materia orgánica aportada al suelo, mediante los fangos de depuradora, haya retenido parte de los metales añadidos y por tanto evitando su disponibilidad para los cultivos de lechuga y rábano.

El contenido de lípidos y carbohidratos no se vio afectado en ninguna de las plantas cultivadas en el invernadero, lechuga y rábano. Alvarado (2020) obtuvo valores similares a los nuestros en el contenido de lípidos de rábanos fertilizados con fangos de depuradora y cultivados en parcela. No obstante, el contenido de carbohidratos en rábanos en su estudio fueron superiores a los obtenidos en nuestro cultivo de rábanos. El grupo de Margenat et al. (2018) obtuvo que la variación del contenido de lípidos y carbohidratos en lechugas se debe en gran parte a la estación en que se cultiva (verano o invierno).

Lechuga

La biomasa de las hojas lechuga no se vio afectada por las diferentes dosis de Zn y Cu añadidas al medio. Gharbi et al. (2005) obtuvieron que plantas de lechuga, en suelo de tipo franco arcilloso, no tenían diferencias significativas en cuanto a materia seca de hojas pero sí en las raíces, donde hubo un descenso a medida que aumentaba la concentración de Cu (0, 100, 250, 500 y 1000 mg Cu/Kg). En cuanto a número de hojas y longitud más larga no se obtiene una diferencia que sea significativa. Cabe destacar que Jaray (2019), utilizando las mismas condiciones de cultivo similares a las de este trabajo experimental, obtuvo mayor número de hojas y mayor longitud de hojas en lechugas fertilizadas con fangos de depuradora y 100 UF (unidades fertilizantes). Las plantas de lechuga no presentaron disminución o aumento en sus parámetros de crecimiento y biomasa. En general, las lechugas parecen tener tolerancia a las dosis de Zn y Cu añadidas al medio en este trabajo experimental. Gharbi et al. (2005) obtuvieron como resultado que las plantas de lechuga acumulaban Cu en mayor proporción en la raíz que plantas de espinaca.

Rábano

Respecto al crecimiento de los rábanos, el número de hojas y longitud de hoja más larga no deja evidencia que la planta se viera limitada para poder desarrollar su estructura. El peso fresco y seco de la parte aérea de los rábanos tampoco muestra una disminución en sus valores. Además, nuestros resultados de peso fresco y peso seco presentan valores muy similares a los publicados por Jurado (2020) en cultivo de rábanos con fangos de depuradora y producidos en parcela al aire libre. En cuanto a la parte subterránea del rábano (bulbo), los valores de peso fresco y seco tampoco muestran una alteración que evidencie un menor desarrollo. Cabe destacar que los

promedios de peso seco de plantas tratadas con dosis D2, están al límite de la significancia de ser inferiores a plantas con dosis D4 y D0 ($p=0,051$).

En cuanto al contenido de clorofila, la dosis D2 parece tener un efecto negativo en los rábanos ya que obtuvimos valores inferiores respecto a plantas con dosis D4 y D0. Reichman (2002) expone que plantas en contacto con altas dosis de Cu pueden provocar una reducción de contenido en clorofila en plantas pero no así en biomasa. Esta deficiencia de contenido en clorofila, también puede resultar de la competencia que tienen los iones de Cu y Fe en la raíz de la planta y que resulta en la menor absorción de Fe (Pätsikkä et al., 2002). En la investigación realizada por Ebbs & Kochian (1997) obtienen que las concentraciones de Fe y Mn en planta son inferiores cuando la planta está expuesta a concentraciones de 6,5 y 0,32 mg/L de Zn y Cu, respectivamente.

Conclusiones

Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- El cultivo de lechugas no refleja un efecto tóxico de los metales pesados añadidos en diferentes dosis. La biomasa, el contenido de clorofilas y lípidos y carbohidratos no se vieron afectados por la adición de metales.
- En cuanto a los rábanos, no se vio afectada significativamente la biomasa aérea (hojas) y subterránea (bulbo) de las plantas con ninguna de las dosis de metales añadidas.
- El contenido de clorofilas de los rábanos se vio reducido en plantas tratadas con dosis media (D2) de metales pesados. Las plantas tratadas con dosis D0 y D4 presentan valores similares de clorofilas a, b y totales.
- En general, el cultivo de hortalizas no presentó síntomas externos de toxicidad como clorosis o mayor senescencia de hojas.

Referencias

- Alvarado, A. (2020). Efecto de la incorporación de diferentes abonos orgánicos en el desarrollo y contenido en lípidos, azúcares y clorofilas en cultivos de hortalizas (Trabajo final de grado). *Universitat Politècnica de Catalunya*. <http://hdl.handle.net/2117/178013>
- Alves, L., Reis, A., Grato, P. (2016). Heavy metals in agricultural soils: From plants to our daily life. *Científica*, 44, 346. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n3p346-361>
- Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., Mittal, N. (2008). Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chem.*, 111(4), 811–815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.049>
- Ashraf, S., Ali, Q., Zahir, Z. A., Ashraf, S., Asghar, H. N. (2019). Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 174, 714–727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.068>
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.-F., Lutts, S., Cai, G., Guerriero, G. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environ. Exp. Bot.*, 161, 98–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017>
- Chibuike, G. U., Obiora, S. C. (2014). Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Appl. Environ. Soil Sci.*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/752708>
- Clemens, S., Ma, J. F. (2016). Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67, 489–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301>



- Ebbs, S., Kochian, L. (1997). Toxicity of Zinc and Copper to Brassica Species: Implications for Phytoremediation. *J. Environ. Qual.*, 26, 776–781. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030026x>
- Eissa, M., Negim, O. (2018). Heavy metals uptake and translocation by lettuce and spinach grown on a metal-contaminated soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 18, 1097–1107. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162018005003101>
- Generalitat de Catalunya. (2017). LLEI 5/2017, del 28 de març, de mesures fiscals, administratives, financeres i del sector públic i de creació i regulació dels impostos sobre grans establiments comercials, sobre estades en establiments turístics, sobre elements radiotòxics, sobre begudes ensucrades envasades i sobre emissions de diòxid de carboni. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya. <https://portaljuridic.gencat.cat/eli/es-ct/l/2017/03/28/5>
- Gharbi, F., Rejeb, S., Ghorbal, M. H., Morel, J. L. (2005). Plant Response to Copper Toxicity as Affected by Plant Species and Soil Type. *J. Plant Nutr.*, 28(3), 379–392. <https://doi.org/10.1081/PLN-200049147>
- Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (1990). Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. BOE, 262, 32339-32340. <https://www.boe.es/eli/es/rd/1990/10/29/1310>
- Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R. P., Kumar, A. (2019). Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Sci. Total Environ.*, 651, 2927–2942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>
- Hurtado, C. (2017). Fate and effects of waterborne contaminants of emerging concern in the soil-plant system: impact of biochar soil amendment to mitigate their plant uptake (PhD thesis). *Universitat Politècnica de Catalunya*. <http://hdl.handle.net/2117/112421>

- Inskeep, W., Bloom, P. (1985). Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiol.*, 77, 483–485. <https://doi.org/10.1104/pp.77.2.483>
- Intawongse, M., Dean, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Addit. Contam.*, 23(1), 36–48. <https://doi.org/10.1080/02652030500387554>
- Jaray, S. (2019). Estudio del efecto de uso de fertilizantes orgánicos sobre el desarrollo y contenido de lípidos, azúcares y clorofilas en cultivo de *Lactuca sativa* L. en invernadero (Trabajo final de grado). *Universitat Politècnica de Catalunya*. <http://hdl.handle.net/2117/166853>
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(18), 13772–13799. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>
- Krämer, U., Clemens, S. (2006). Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. En: Tamas, M. J., Martinoia, E. (Eds.), *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man* (pp. 215–271). https://doi.org/10.1007/4735_96
- Kumar, P., Tewari, R. K., Sharma, P. N. (2008). Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants. *Plant Cell Rep.*, 27(2), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0453-1>
- Luo, Y., Rimmer, D. L. (1995). Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 88(1), 79–83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)91050-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)91050-U)
- Margenat, A., Matamoros, V., Díez, S., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M. (2018). Occurrence and bioaccumulation of chemical contaminants in lettuce grown in peri-urban horticulture. *Sci. Total Environ.*, 637–638, 1166–1174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.035>



- Margenat, A. (2018). Dynamics of chemical microcontaminants in peri-urban agriculture and evaluation of their potential impact on crops and human health (PhD thesis). *Universitat Politècnica de Catalunya*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/664083#page=1>
- Nadal, M. (2015). Efecte de la incorporació de biochar al sòl i estrès abiòtic de contaminants orgànics emergents presents en l'aigua de reg en la producció de biomassa de *Lactuca sativa* (Treball Final de Grau). *Universitat Politècnica de Catalunya*. <http://hdl.handle.net/2117/78334>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Naz, A., Khan, S., Muhammad, S., Khalid, S., Alam, S., Siddique, S., Toqeer, A., Scholz, M. (2015). Toxicity and Bioaccumulation of Heavy Metals in Spinach (*Spinacia oleracea*) Grown in a Controlled Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 7400–7416. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707400>
- Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Sersen, F., Aro, E.-M., Tyystjärvi, E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol.*, 129(3), 1359–1367. <https://doi.org/10.1104/pp.004788>
- Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., Kim, K.-H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ. Int.*, 125, 365–385. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.*, 180(2), 169–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Reichman, S. (2002). The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. En: *Australian Minerals & Energy Environment foundation* (Vol. 7).

- Rorat, A., Courtois, P., Vandenbulcke, F., Lemiere, S. (2019). *8 - Sanitary and environmental aspects of sewage sludge management* (Prasad, M. N. V., de Campos Favas, P. J., Vithanage, M., Mohan, S. V., eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815907-1.00008-8>
- Rrong, W., Aiping, T., Ashraf, M. A. (2016). The effects of applying sewage sludge into Jiangxi red soil on the growth of vegetables and the migration and enrichment of Cu and Zn. *Saudi J. Biol. Sci.*, 23(5), 660–666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.028>
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., Adam, V. (2018). Zinc, zinc nanoparticles and plants. *J. Hazard. Mater.*, 349, 101–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M. (2011). A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- Wang, A. S., Angle, J. S., Chaney, R. L., Delorme, T. A., Reeves, R. D. (2006). Soil pH Effects on Uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil*, 281(1), 325–337. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4642-9>
- Zengin, F. K., Munzuroglu, O. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.*, 47.

